



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA COX-2 EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELA

DANIELA CRISTINA SOBREIRO MARQUES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente

Doutora Luisa Maria Freire Leal Mateus

Vogais

Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

ORIENTADORA

Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

2013

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA COX-2 EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELA

DANIELA CRISTINA SOBREIRO MARQUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente

Doutora Luisa Maria Freire Leal Mateus

Vogais

Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

ORIENTADORA

Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

2013

LISBOA

Agradecimentos

À Professora Doutora Conceição Peleteiro, por me ter aceitado como sua orientanda, pela partilha de conhecimentos imprescindíveis para a realização deste trabalho, assim como toda a ajuda e disponibilidade demonstradas.

Ao Professor Doutor Fernando Ferreira, meu co-orientador, por toda a ajuda, motivação e apoio prestado.

À Dra. Sandra Carvalho e Dra. Maria João Soares um muito obrigado, por toda a ajuda e ensinamentos transmitidos no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. João Cota, agradeço também pela ajuda e paciência.

À D^a Maria do Rosário, D^a Maria Augusta e D^a Manuela Gonçalves pelo auxílio e simpatia.

À Daniela, Tiago, André e Nuno, meus colegas de estágio, pelo companheirismo e boa disposição.

À Professora Doutora Luísa Mateus por ter gentilmente cedido um dos anticorpos anti-COX-2 utilizados neste trabalho, nomeadamente o clone 33.

À Menarini Diagnostics, Lda. por ter facultado o anticorpo anti-COX-2, clone SP21 que possibilitou o enriquecimento deste estudo.

À Professora Doutora Isabel Neto pelos esclarecimentos relativamente à análise estatística.

À Merial portuguesa – Saúde Animal Lda, por ter providenciado o “Kit” de deteção essencial à realização deste trabalho.

Aos meus pais, irmão e avós, por todo o apoio que me têm dado ao longo da vida, nos bons e nos maus momentos, pois só desta forma me foi possível chegar até aqui.

Ao meu namorado Ricardo, pelo apoio incondicional e por toda motivação e carinho.

Às minhas colegas e amigas Daniela Cunha e Sofia Reis, por todos os momentos que passámos juntas ao longo destes 6 anos de curso, por toda a amizade, todas as alegrias e peripécias que nunca iremos esquecer.

Aos meus cães, e em especial ao Nico por ter sido o principal impulsionador da minha entrada no curso de Medicina Veterinária.

Resumo – Avaliação da expressão da COX-2 em tumores mamários de cadela

A ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma proteína que se encontra envolvida na oncogénese e na inflamação, tendo sido demonstrada a sua sobreexpressão em diversas neoplasias humanas e animais. Nos tumores mamários esta enzima está associada a indicadores de pior prognóstico, tanto na mulher como na cadela. Adicionalmente, a utilização de fármacos inibidores da COX-2 demonstrou uma diminuição da incidência e da capacidade metastática em mulheres portadoras de cancro da mama. Também nos tumores mamários de cadela existe a evidência de que a utilização destes fármacos tem efeitos benéficos na melhoria da qualidade de vida e no aumento do tempo de sobrevivência.

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a expressão da COX-2 em neoplasias mamárias caninas e a sua associação com diversos parâmetros clinico-patológicos, de forma a investigar a importância desta proteína como um futuro alvo terapêutico. A expressão da COX-2 foi avaliada em 21 amostras de tumores por imunohistoquímica (IHQ), utilizando dois anticorpos anti-COX-2. Como controlo positivo foi utilizado útero de cadela com piómetra. A percentagem de células positivas nos tumores analisados foi classificada semi-quantitativamente do seguinte modo: 0 - <10%; 1 - 10-25%; 2 - 26-50%; 3 - 51-75%; 4 - 76-100%. A classificação da intensidade de marcação foi distribuída por quatro categorias: 1 - discreta (+); 2 - moderada (++); 3 - intensa (+++); 4 - muito intensa (++++). Tendo em conta estes dois parâmetros, foi atribuída uma pontuação a cada neoplasia resultante da soma dos dois valores analisados.

A IHQ realizada com o clone 33 revelou que a grande maioria dos tumores da amostra (85,7%) demonstraram ter menos de 10% de células positivas e intensidade de marcação 3 (+++), resultando numa pontuação final de 3. Ainda com este clone foram classificados dois tumores com pontuação 5 (1 - 10-25%; 4 - +++) e um com 6 (2 - 26-50%; 4 - +++++). O padrão de marcação observado foi de tipo citoplasmático difuso e perinuclear. Relativamente ao clone SP21, 95,2% das neoplasias demonstraram positividade de nível 4 (76-100%) e intensidade entre 3 (+++) e 4 (++++), resultando na atribuição de pontuações de 7 e 8, respectivamente. Com este clone foi observado tanto um padrão de marcação membranar como um padrão citoplasmático difuso e perinuclear. Este último foi comum aos dois anticorpos e observado nos mesmos tumores, correspondendo a neoplasias menos diferenciadas. No presente estudo, a expressão da COX-2 revelou associação estatisticamente significativa com o tamanho e grau de diferenciação dos tumores.

Será necessário mais investigação nesta área de modo a estabelecer quais os anticorpos, protocolos e respectivos padrões de marcação que se correlacionam inequivocamente com níveis elevados da expressão da COX-2, para que inibidores desta proteína possam ser testados como terapia.

Palavras-chave: ciclooxigenase-2; tumor mamário; cadela

Abstract – Evaluation the expression of COX-2 in canine mammary tumours

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is a protein involved in oncogenesis and inflammation and its overexpression has been demonstrated in several human and animal neoplasias. In mammary tumours this enzyme is associated with indicators of poor prognosis, in both human and canine species. Additionally, the use of drugs inhibitors of COX-2 showed reduction in incidence and metastatic capability in women with breast cancer. Also in canine mammary tumours, there is evidence that the use of these drugs have beneficial effects in improving the quality of life and increasing survival time.

The main purpose of this study was to evaluate COX-2 expression in canine mammary neoplasias and its association with clinicopathological parameters, in order to investigate the importance of this protein as a future therapeutic target. The expression of COX-2 was evaluated in 21 tumour samples by immunohistochemistry (IHQ), using two anti-COX-2 antibodies. Canine uterus with pyometra was used as positive control.

The percentage of cellular positivity in each tumour was classified semi-quantitatively as follows: 0 - <10%; 1 - 10%-25%; 2 - 26-50%; 3 – 51-75%; 4 – 76-100%. The grading of intensity of the labelling was distributed by four categories: 1 - discrete (+); 2 - moderate (++); 3 - intense (+++); 4 - very intense (++++). Given these two parameters a score was assigned to each tumour, resulting from the sum of the two values.

IHQ with clone 33 revealed that the majority of tumour samples (85,7%), had less than 10% of positive cells, and a labelling intensity of 3 (+++), resulting in a final score of 3. Also with this clone two tumours were classified as 5 (1 – 10-25%; 4 - ++++), and one as 6 (2 - 26-50%; 4 - ++++). The labelling observed was diffuse cytoplasmic and perinuclear.

With clone SP21, 95,2% of the neoplasias revealed positivity in 76-100% of the cells, and intensity between 3 (+++) and 4 (++++), resulting in final scores of 7 and 8. With this clone both cell membrane as diffuse cytoplasmic and perinuclear labelling were observed. This last pattern was common in the same tumours with both antibodies, corresponding to poorly differentiated neoplasias. In the present study, COX-2 expression revealed a statistically significant association with tumour size and grading.

More investigation in this field is required, in order to definitively establish a protocol and labelling pattern that unequivocally correlate with the levels of COX-2 expression, so that COX-2 inhibitors can be tested for therapeutic benefits.

Keywords: cyclooxygenase-2; mammary tumour; bitch

Índice geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice geral	iv
Lista de figuras	vii
Lista de tabelas.....	viii
Lista de gráficos.....	viii
Lista de símbolos e abreviaturas.....	ix
Capítulo I - Breve descrição das atividades desenvolvidas no decorrer do estágio curricular	1
Capítulo II - Introdução.....	2
Capítulo III - Revisão bibliográfica.....	3
III.1 - Anatomia da glândula mamária.....	3
III.2 - Tumores mamários na cadela – etiologia e epidemiologia	4
III.2.1 – Idade, localização, sexo, incidência, raça	4
III.2.2 – Fatores hormonais	5
III.2.2.1 – Esterilização	5
III.2.2.2 – Estrogênio, progesterona, prolactina e hormona do crescimento.....	6
III.2.3 - Outros fatores	8
III.2.3.1 – Dieta	8
III.2.3.2 – Viral	9
III.2.3.3 – COX-2.....	9
III.3 - Apresentação clínica	9
III.4 - Diagnóstico e estadiamento	11
III.5 - Classificação histológica de tumores mamários caninos	12
III.6 - Abordagem terapêutica	14
III.6.1 – Cirurgia.....	14
III.6.2 – Quimioterapia e radioterapia.....	15
III.6.3 – Imunoterapia.....	16

III.6.4 – Terapia hormonal	16
III.7 - Prognóstico	17
III.7.1 – Tamanho tumoral	17
III.7.2 – Envolvimento dos linfonodos	17
III.7.3 – Metástases à distância	18
III.7.4 – Invasão tecidual e vascular	18
III.7.5 – Grau de diferenciação nuclear	19
III.7.6 – Tipo histológico.....	19
III.7.7 – Grau de malignidade.....	20
III.7.8 – Infiltração celular linfóide	21
III.7.9 – Aneuploidia e células em fase S.....	22
III.7.10 – AGNOR - Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas	22
III.8 - Carcinogénese mamária canina: marcadores moleculares	22
III.8.1 – p53	22
III.8.2 – p63	23
III.8.3 – Ki-67 e PCNA.....	23
III.8.4 – HER-2.....	24
III.8.5 – EGFR	25
III.8.6 – BRCA1 e BRCA2.....	25
III.8.7 – MMPs	25
III.8.8 – PTEN	26
III.8.9 – Sialyl Lewis x	26
III.8.10 – Genes reguladores da apoptose	27
III.9 - Ciclooxygenases	27
III.9.1 - COX-2: papel na carcinogénese.....	28
III.9.2 - COX-2: cancro em humanos.....	31
III.9.3 - COX-2 : tumores mamários de cadela	32
III.9.4 - Inibidores da COX-2: uso preventivo e terapêutico	34

Capítulo IV – Trabalho experimental	36
IV.1 – Objetivos.....	36
IV.2 - Material e Métodos	37
IV.2.1 - Recolha de material	37
IV.2.2 - Avaliação histopatológica	37
IV.2.3 Estudo imunohistoquímico	38
IV.2.3.1 Procedimento adotado	38
IV.2.3.2 - Avaliação imunohistoquímica de expressão da COX-2.....	40
IV.2.3.3 – Análise estatística	41
Capítulo V - Resultados	42
V.1 – Variáveis clinico-patológicas.....	42
V.1.1 Idade, raça e estatuto reprodutivo	42
V.1.2 – Características associadas ao tumor	43
V.2 Avaliação da expressão da COX-2 nos tumores mamários caninos da amostra	47
V.2.1 – Clone 33	47
V.2.2 – Clone SP21	49
V.2.3 – Pontuação atribuída a cada neoplasia e respectivo padrão predominante – análise comparativa entre os dos anticorpos utilizados	51
V.3 – Associação estatística da sobreexpressão da COX-2 com variáveis clinico-patológicas	53
V.4 – Pontuação da COX-2 e tempo de sobrevivência.....	55
Capítulo VI – Discussão.....	56
Capítulo VII – Conclusões.....	60
Bibliografia	62
Anexos.....	76
Anexo 1- Resumo da comunicação oral realizada no Congresso do Hospital Veterinário Montenegro (23 e 24 de fevereiro de 2013, Porto, Portugal)	76
Anexo 2 – Poster exposto no Congresso da European Society of Veterinary Oncology (ESVONC), (30 de maio a 1 de junho de 2013, Lisboa, Portugal)	77

Lista de figuras

Figura 1 - Papel da prostaglandina E ₂ (PGE ₂) na carcinogénese (adaptado de Wang & Dubois, 2006).	30
Figura 2 - Técnica de marcação da área tumoral nos blocos de parafina com biótomo de 6mm de diâmetro.	38
Figura 3 - (A) Carcinoma túbulo-papilífero (H&E, x100); (B) Carcinoma anaplásico (H&E,x100).	45
Figura 4 – (A) Carcinoma sólido comedónico (H&E, 40x); (B) Mioepitelioma maligno (H&E, 100x).....	46
Figura 5 - Marcação imunohistoquímica obtida com os anticorpos anti-vimentina e anti-citoqueratina utilizados para classificação histológica de um mioepitelioma maligno.	46
Figura 6 - Metástases em linfonodo e ovário.....	47
Figura 7 - Carcinoma tubular de grau I.....	48
Figura 8 - Carcinoma anaplásico de grau III.....	48
Figura 9 - Mioepitelioma maligno de grau III	48
Figura 10 - Carcinoma papilífero de grau II	49
Figura 11 - Glândula mamária não neoplásica.....	50
Figura 12 - Carcinoma papilífero de grau III	50
Figura 13 - Carcinoma anaplásico de grau III.....	50
Figura 14 - Diferença de marcação obtida com os dois clones utilizados.....	51

Lista de tabelas

Tabela 1 - Sistema modificado de estadiamento de tumores mamários caninos (segundo Lana et al., 2007)	12
Tabela 2 - Nova classificação histológica de tumores mamários caninos: 2010 (segundo Goldschmidt et al., 2011)	13
Tabela 3 - Critérios histológicos para atribuição do grau de malignidade (segundo Goldschmidt et al., 2011).	20
Tabela 4 - Grau de malignidade de neoplasias (segundo Goldschmidt et al., 2011)	21
Tabela 5 - Protocolo de imunohistoquímica utilizado no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa.	39
Tabela 6 - Anticorpos primários anti-COX-2 e protocolos adotados	40
Tabela 7 - Sistema adotado para quantificação de positividade de COX-2 nos tumores mamários.	41
Tabela 8 - Sistema adotado para classificação da intensidade de marcação para a COX-2.41	
Tabela 9 - Características tumorais da amostra (frequências absolutas e relativas).	44
Tabela 10 - Pontuação atribuída a cada neoplasia e padrão de marcação predominantemente observado.	52
Tabela 11 - Correlação estatística entre a pontuação obtida para a COX-2 e as variáveis clínico-patológicas avaliadas.	53
Tabela 12 - Pontuações obtidas para a COX-2 nas neoplasias em estudo e respetiva condição atual dos animais.	55

Lista de gráficos

Gráfico 1 - Distribuição da amostra de acordo com a idade	42
Gráfico 2 - Distribuição da amostra de acordo com a raça	42
Gráfico 3 - Distribuição da amostra de acordo com o estatuto reprodutivo.	43

Lista de símbolos e abreviaturas

® - Marca registada

15-PGDH - 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-hidroxiprostaglandina desidrogenase)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AgNORs – Argyrophilic nucleolar organizer regions (Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas)

AINEs - Anti-inflamatórios não esteróides

Akt – protein Kinase B (proteína quinase B)

APC^{min} - modelo murino para a Polipose Adenomatosa Familiar com mutação no gene *Apc*,
Min – multiple intestinal neoplasia

bFGF –Fibroblast growth factor (Factor de crescimento de fibroblastos)

BRCA1 – Breast Cancer type 1 susceptibility protein

BRCA2 – Breast Cancer type 2 susceptibility protein

CGA – Campo de grande ampliação

COX-1 – Ciclooxygenase-1

COX-2 – Ciclooxygenase-2

COX-3 – Ciclooxygenase-3

DAB - Tetra-hidrocloreto de 3,3'-Diaminobenzidina

EGF – Epidermal growth factor (Factor de crescimento epidérmico)

EGFR - Epidermal growth factor receptor (receptor do fator de crescimento epidérmico)

EPI - recetores para a PGE₂ nos mamíferos

EUA – Estados Unidos da América

FMV – Faculdade Medicina Veterinária de Lisboa

GH - Growth hormone (Hormona do crescimento)

H&E - Hematoxilina-eosina

HER2/neu - Human Epidermal growth factor Receptor 2 (Receptor do factor de crescimento epidérmico humano tipo-2)

HIF-1α – Hypoxia –inducible factor 1α (Factor inductor de hipoxia 1α)

IGF-1 - Insuline-like growth factor-I (Fator I de crescimento tipo insulina)

IGF-2 – Insuline-like growth factor-II (Factor II de crescimento tipo insulina)

IgG - Imunoglobulina G

IL - Interleucina

LOX – lipoxygenase (Lipoxigenase)

LPS - lipopolissacarídeo

M – Metastização à distância (Sistema de classificação TNM)

MMP - Matrix metalloproteinases (Metaloproteinase de matriz)

MMTV – mouse mammary tumor virus (vírus do tumor mamário murino)

n - Número de casos

N – Linfonodos regionais (Sistema de classificação TNM)

NF-Kb – Nuclear factor kappa b (Factor nuclear kappa b)

p – Nível de significância estatística

PAF – Polipose adenomatosa familiar

PBS - Tampão fosfato salino

PCNA – Proliferating Cell Nuclear Antigen (Antigénio do núcleo de células em proliferação)

PDGF – Platelet-derived growth factor (Factor de crescimento derivado de plaquetas)

PG - Prostaglandinas

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PGG₂ – prostaglandina G₂

PGH₂ - Prostaglandina H₂

PGI₂ – prostaciclina

PI3k – phosphoinositide 3-kinase (fosfoinosítídeo 3-quinase)

PPARs - Peroxisome proliferator-activated receptors (Receptores activados por proliferadores peroxissomais)

PTEN – Phosphatase and Tensin homolog (Proteína homóloga da fosfatase e tensina)

RE - Recetor de Estrogénio

ROS – Reactive oxygen species (Espécies reactivas de oxigénio)

RP - Recetores de Progesterona

sLx – Sialyl Lewis x

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

STAT-3 - Signal transducer and activator of transcription 3 (Transdutor de sinal e activador de transcrição 3)

T – Tamanho da neoplasia primária (Sistema de classificação TNM)

TGF- β –Transforming growth factor β (Factor de transformação de crescimento β)

Th1 – Linfócito T helper tipo 1

Th2 – Linfócito T helper tipo 2

TNF- α - Factor de necrose tumoral alfa

TNM – Tumor-linfonodo-Metástase (Sistema de classificação TNM)

TX - Tromboxanos

ULisboa – Universidade de Lisboa

VEGF - Vascular endothelial growth factor (factor de crescimento do endotélio vascular)

Capítulo I - Breve descrição das atividades desenvolvidas no decorrer do estágio curricular

O estágio curricular que permitiu a realização deste trabalho foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (FMV) da Universidade de Lisboa (ULisboa), no período compreendido entre 1 de outubro de 2012 e 22 de fevereiro de 2013.

A primeira etapa do período de estágio consistiu na seleção dos tumores a estudar, existentes no arquivo do Laboratório, com posterior visualização dos respetivos cortes corados com hematoxilina eosina e recolha dos dados constantes nas fichas clínicas e nas requisições da análise histopatológica, tendo este processo como objetivos: selecionar neoplasias com as características mais adequadas ao estudo a realizar, promover a familiarização com a visualização de tumores mamários, sua classificação histológica e critérios de atribuição do grau de malignidade.

Posteriormente, foi realizado o acompanhamento da técnica de imunohistoquímica, através da visualização do processo com intervenção ativa, sempre que possível, tanto no decorrer da rotina de laboratório, como durante o trabalho de uma aluna de doutoramento. Simultaneamente, foi feita a seleção dos protocolos mais adequados aos anticorpos a ser testados.

Numa segunda fase, foi efetuado o corte dos blocos de material incluído em parafina para seleção das áreas a marcar por imunohistoquímica, nos tumores selecionados. No final de cada imunohistoquímica, procedeu-se à sua avaliação através da observação microscópica e da contagem de células.

Foi ainda elaborada uma apresentação oral relativa ao trabalho realizado, no Congresso do Hospital Veterinário Montenegro (23 e 24 de Fevereiro de 2013) (Anexo-1), assim como a exposição de um poster no congresso da European Society of Veterinary Oncology (ESVONC), que decorreu entre o dia 30 de maio e 1 de junho do mesmo ano, em Lisboa (Anexo-2).

Capítulo II - Introdução

Os tumores mamários representam a neoplasia mais frequente em cadelas. Um estudo realizado em Itália, entre 1985 e 2002, onde foram avaliados todos os tumores caninos diagnosticados neste período, mostrou que os tumores mamários correspondem a 70% do total de tumores diagnosticados em cadelas (Merlo et al., 2008).

O paralelismo dos tumores mamários na mulher e na cadela tem vindo a ser sublinhado, possuindo ambas as espécies várias características em comum, nomeadamente, marcadores moleculares, características histológicas, genética, comportamento biológico e resposta ao tratamento. Desta forma, a utilização da cadela como um possível modelo para o estudo do cancro de mama na mulher tem vindo já a ser explorada (Uva et al., 2009; Queiroga, Raposo, Carvalho, Prada & Pires, 2011a).

Vários estudos realizados nos últimos anos, tanto em medicina humana como veterinária, têm provado a importância da sobreexpressão da cicloxigenase-2 (COX-2) no desenvolvimento, progressão e prognóstico tumoral, assim como a sua relevância na terapêutica através da utilização de inibidores desta proteína.

O presente trabalho teve como objectivos: otimizar os protocolos de dois anticorpos primários anti-COX-2 em tecidos mamários de cadela, avaliar a expressão da COX-2 numa amostra de 21 tumores mamários de cadela, seleccionados do Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa e comparar os resultados obtidos com os já publicados na literatura da especialidade.

III.1 - Anatomia da glândula mamária

A mama é uma glândula túbulo-alveolar especializada na produção e secreção de leite, característica específica dos mamíferos (Monteiro-Riviere, Stinson & Lois Calhoun, 1994; Barone 1999;).

Durante a embriogénese a formação da glândula mamária está representada por espessamentos lineares na parede abdominal ventral, dando lugar à formação de duas cristas paralelas. À medida que prossegue o desenvolvimento embrionário, estas cristas sofrem interrupções sectoriais, definindo o número de glândulas primordiais próprias de cada espécie (Cunningham, 2004).

Em ambos os sexos, estas glândulas sofrem um desenvolvimento semelhante até à puberdade, após o qual, e apenas nas fêmeas, se desenvolvem, sob influência da estimulação hormonal. Atingem o seu desenvolvimento máximo no final da gestação com o nascimento das crias e na lactação, regredindo após a sua finalização (Burkitt, Young, & Heath, 1994; Barone, 1999).

Histologicamente, as unidades funcionais da glândula mamária são os alvéolos que se encontram agrupados em lóbulos. O epitélio de revestimento dos alvéolos e dos seus ductos é constituído por uma população dupla de células: uma camada interna de epitélio simples cúbico, cuja morfologia celular varia consoante os diversos estádios de atividade secretora; uma camada externa de células mioepiteliais, cuja função é a contrair-se sob ação da ocitocina, promovendo a expulsão do leite (Monteiro-Riviere et al., 1994; Barone, 1999).

Através da observação por microscopia óptica, o epitélio secretor quando está em repouso é baixo ou cubóide, o núcleo oval, o citoplasma pouco abundante e homogéneo, e os limites são poucos definidos. Na fase de secreção, as células tornam-se, pelo contrário, altas e o citoplasma abundante (Barone, 1999).

Cada lobo mamário resulta da junção de vários lóbulos, cuja estrutura corresponde a conjuntos de alvéolos e seus respetivos ductos alveolares (Burkitt et al., 1994). Os lóbulos mamários encontram-se separados entre si por tecido conjuntivo, sendo este fibroso, moderadamente denso. Já o tecido conjuntivo que reveste os ductos alveolares, denominado tecido intralobular, é menos denso e mais celular. Os constituintes celulares inflamatórios habituais do tecido intralobular são linfócitos e plasmócitos (Burkitt et al., 1994; Monteiro-Riviere et al., 1994).

Os ductos correspondentes a cada lóbulo, drenam em canais excretores de maior calibre, denominados ductos lactíferos, que vão, por sua vez, formar uma dilatação ampolar antes de atingir o mamilo, chamada seio lactífero (Burkitt et al., 1994).

As glândulas mamárias distribuem-se em duas cadeias e a sua nomenclatura é atribuída consoante a sua localização, sendo que, na cadela, se identificam geralmente 5 pares de glândulas: 2 pares torácicos (craniais e caudais); 2 pares abdominais (craniais e caudais); 1 par inguinal. Apesar de pouco frequente, é possível algumas cadelas apresentarem 4 ou 6 pares de glândulas (Barone, 1999).

Relativamente à circulação sanguínea os principais vasos que irrigam as glândulas mamárias são: os ramos lateral e ventral de artéria intercostal e as artérias torácica interna e lateral que irrigam os dois pares de mamas torácicas; os vasos epigástricos superficiais craniais que irrigam o segundo par torácico e o primeiro abdominal; e os vasos epigástricos superficiais caudais que irrigam o segundo par abdominal e o par inguinal (Fossum, 2007).

A drenagem linfática dos três pares de glândulas craniais é feita, maioritariamente, através do linfonodo axilar, enquanto que o linfonodo inguinal superficial é tributário dos dois pares caudais (Fossum, 2007).

Em situações normais, a circulação linfática estabelece ligação entre algumas glândulas homolaterais. É, no entanto, importante salientar que a circulação linfática pode alterar-se no decorrer de um processo neoplásico, estando já descrita a comunicação entre as cadeias direita e esquerda, assim como entre glândulas adjacentes de uma mesma cadeia em direção cranial e caudal. Estas alterações têm significado clínico pois a disseminação de metástases linfáticas pode fazer-se sem obedecer ao fluxo normal da corrente linfática (Queiroga & Lopes, 2002).

III.2 - Tumores mamários na cadela – etiologia e epidemiologia

III.2.1 – Idade, localização, sexo, incidência, raça

Na cadela, as neoplasias mamárias são os tumores que ocorrem com maior frequência, correspondendo entre 41 a 53% do total a tumores malignos. Surgem geralmente em animais com idade superior a 6 anos, sendo mais atingidas cadelas entre os 10 e os 11 anos. O aparecimento desta neoplasia antes dos 4 anos é raro, e está normalmente associado a benignidade (MacEwen & Withrow, 1989; Perez-Alenza, Peña, Del Castillo & Nieto, 2000; Misdorp, 2002; Lana, Rutteman & Withrow, 2007).

Em relação à localização, o desenvolvimento de tumores e de displasias aumenta em número quanto mais caudal for a glândula mamária, sendo, portanto, as mamas abdominais e inguinais as mais afetadas (Misdorp, 2002; Peleteiro, 1994).

Nos canídeos do sexo masculino, a neoplasia mamária é uma entidade de ocorrência rara, estando, na maioria das vezes, associada a disfunções hormonais, nomeadamente a sertolinomas (Misdorp 2002; Peleteiro, 1994).

Relativamente à incidência, um estudo realizado no Reino Unido, em 2002, demonstrou que, por ano, 205 em 100 000 cães desenvolveram tumores de mama, valor semelhante ao já demonstrado por MacEwen e Withrow, em 1989, que foi de 198,6 por cada 100 000 animais. (MacEwen & Withrow, 1989; Dobson, Samuel, Milstein, Rogers & Wood, 2002).

Num estudo um pouco mais recente realizado na Suécia, com uma amostra de 80 000 cadelas com idades compreendidas entre 3 e 10 anos, que foram seguidas entre 1995 e 2002, os resultados foram uma incidência de 111 tumores mamários por cada 10 000 animais por ano. Ainda neste estudo foi possível concluir que a incidência aumenta com a idade, sendo que esta é de 1% aos 6 anos, 6% aos 8 anos e de 13% aos 10 anos (Egenvall et al., 2005).

Apesar dos tumores mamários poderem ocorrer em cadelas de qualquer raça, existem estudos que apontam algumas raças como predispostas.

Dois estudos apontam as raças Cocker Spaniel, Caniche e Teckel como tendo maior predisposição para estes tumores (Priester & Mackay, 1980; Zatloukal et al., 2005).

Um outro estudo, realizado em 2005, concluiu que os cães de raças de porte pequeno são menos propensos a esta afeção comparativamente a outras raças. Neste estudo, com uma amostra de 101 animais (60 de raças de porte pequeno e 41 de raças de maior porte), os resultados obtidos foram 25% e 58,5% respetivamente, correspondendo estas percentagens a tumores mamários malignos diagnosticados na amostra (Itoh et al., 2005).

É, no entanto, importante ter em conta que a predisposição para determinadas raças varia de acordo com o local e o tempo, em função das raças que são mais populares em determinados países e períodos. Adicionalmente também existe uma grande percentagem de cães sem raça determinada, pelo que o estabelecimento de um padrão de raças predispostas é complexo (Peleteiro, 1994).

III.2.2 – Fatores hormonais

III.2.2.1 – Esterilização

A esterilização é um fator relevante no desenvolvimento de tumores mamários, pelas características de dependência hormonal que estes apresentam. Enquanto na mulher foi demonstrado um efeito protector conferido pela gravidez precoce, na cadela essa relação não foi ainda provada (Schneider, Dorn & Taylor, 1969), pelo que se aconselha que

esterilização deva ser realizada o mais cedo possível nos animais não destinados a reprodução.

A incidência de tumores mamários em cadela é consideravelmente maior nos países onde a ovariectomia não é uma prática clínica de rotina, como acontece em Espanha e em outros países europeus (Perez-Alenza et al., 2000). A realização deste procedimento antes do 1º cio está descrita como diminuindo a probabilidade do aparecimento de tumores mamários para 0,05%, quando comparada com fêmeas inteiras. Quando a intervenção é realizada antes do 2º cio, a probabilidade aumenta para 8% e após esta data aumenta para 26% (Schneider et al., 1969). Mesmo quando a intervenção é feita numa fase mais avançada da vida do animal possui sempre alguns benefícios, nomeadamente, o facto de diminuir a probabilidade do aparecimento de tumores mamários benignos (Misdorp, 1988).

Um outro estudo retrospectivo revelou igualmente que em cadelas que desenvolveram tumores mamários, a esterilização pode ter influência no prognóstico e no tempo de sobrevivência. De acordo com este estudo, cadelas inteiras ou que tenham realizado a esterilização dois anos ou mais após a remoção do tumor mamário vivem menos tempo que cadelas que tenham feito a esterilização no momento da cirurgia ou até dois anos após a mastectomia (Sorenmo, Shofer & Goldschmidt, 2000).

III.2.2.2 – Estrogénio, progesterona, prolactina e hormona do crescimento

Tanto na mama normal como na neoplásica, o crescimento tecidual é estimulado por hormonas e fatores de crescimento que exercem a sua ação após ligação aos respetivos recetores celulares. Os fatores hormonais apresentam, assim, grande importância no desenvolvimento das neoplasias mamárias, sendo várias as hormonas envolvidas, nomeadamente: o estrogénio, a progesterona, a prolactina e a hormona do crescimento (Misdorp, 2002; Queiroga et al., 2005a).

No decorrer da puberdade, as hormonas esteróides desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do tecido mamário, tal como na gestação, durante a qual ocorre um desenvolvimento significativo das estruturas alveolares sob o efeito da progesterona e dos estrogénios (Lamote, Meyer, Massart-Leen, & Burvenich, 2004).

Na cadela, tal como na mulher, a presença de recetores de estrogénio (RE) parece estar relacionada com o grau de diferenciação tumoral (Block, Jensen, & Polley, 1975; MacEwen, Patnaik, Harvey, & Panko, 1982), estando a sua baixa expressão (em especial da isoforma α) correlacionada com um pior prognóstico (tumores de maiores dimensões e ulceração cutânea) (Martin De Las Mulas et al., 2004).

Num estudo realizado, em 2005, por Milanta e sua equipa, foi avaliada por imunohistoquímica a expressão de recetores de estrogénio e de progesterona (RE e RP) em

85 lesões mamárias caninas, tendo os investigadores concluído que 100% das amostras de mama normal e 95% das lesões benignas, eram positivas para REs. Já os tumores malignos, 92% demonstraram expressão para este recetor, apesar de apenas 62% apresentar marcação nuclear forte, não tendo sido encontradas diferenças significativas na expressão de RE em mama normal, displásica, tumores benignos e lesões malignas *in situ*. É, no entanto, de salientar que a expressão de RE foi significativamente mais baixa nos carcinomas invasivos. Em relação aos RPs, foi observado que a sua expressão foi consideravelmente inferior tanto em tumores benignos como malignos, comparativamente ao tecido mamário normal (Milanta et al., 2005).

Outros estudos revelaram que a quantificação de RE α e de RP é semelhante tanto na mama normal como nos tumores benignos, sendo mais comum a positividade simultânea para os dois recetores (RE α ⁺/RP⁺). Já os tumores malignos apresentam na sua maioria uma diminuição ou mesmo ausência do RE (RE α ⁻/RP⁺) (Chang et al., 2009). À medida que a doença progride e surgem metástases, os tumores tendem a perder a sua dependência hormonal, mostrando-se negativos para ambos os recetores (RE α ⁻/RP⁻) (Rutteman, Misdorp, Blankenstein, & Van Den Brom, 1988; Martin De las Mulas, Millán & Dios, 2005).

A prolactina é uma hormona também com importância no desenvolvimento do epitélio mamário, tendo sido inclusivamente demonstrada que a sua administração favorece o crescimento de tumores mamários em diferentes espécies (Wenbo et al., 1997; Hankinson et al., 1999). Para além da sua ação lactogénica primária, a prolactina exerce numerosos efeitos em diferentes órgãos e tecidos. Em vários estudos foi descrita a sua ação como fator de crescimento, neurotransmissor e imunorregulação em diferentes locais do organismo (tecido ósseo, cérebro, linfócitos, células decíduais da placenta e células epiteliais mamárias). Esta hormona pode ser produzida localmente pelos tecidos referidos, exercendo a sua ação de forma autócrina e/ou parácrina (Wenbo et al., 1997; Llovera, Touraine, Kelly & Goffin, 2000).

Um estudo realizado, em 2005, por Queiroga e seus colegas, com o intuito de clarificar o papel da prolactina e das hormonas esteróides no desenvolvimento de tumores mamários caninos, revelou que os níveis de prolactina eram significativamente superiores nos tumores malignos, comparativamente aos benignos e à glândula normal. Neste estudo, a quantificação hormonal foi feita quer no soro, quer em homogeneizados de tecidos tumorais mamários, verificando-se que nos homogeneizados tecidulares de tumores malignos com níveis elevados de prolactina, o valor obtido no soro não relevou uma elevada concentração desta hormona (Queiroga et al., 2005a). Este resultado está de acordo com as evidências obtidas em estudos realizados em medicina humana, demonstrando que a prolactina existente nos tecidos deverá ser produzida localmente pelas células epiteliais mamárias. Ainda neste estudo foi possível correlacionar positivamente os níveis de prolactina com os níveis de hormonas esteróides, assim como relacionar a sobreexpressão destas hormonas

com características tumorais de malignidade (ulceração, aderência cutânea e aos tecidos vizinhos) (Clevenger, Furth, Hankinson & Shuler, 2003; Queiroga et al., 2005a).

Em cadelas a administração de progestagêneos assim como a própria progesterona endógena induzem um aumento da síntese da hormona do crescimento (GH), sendo esta produzida localmente na glândula mamária à semelhança do que acontece com a prolactina. Paralelamente a esta sobreexpressão, também ocorre elevação do fator de crescimento insulínico tipo I (IGF-1) e do fator de crescimento insulínico tipo II (IGF- 2) (Mol et al., 1997). O IGF-1 é um potente agente mitogénico e anti-apoptótico, necessário para que estrogénio e progesterona exerçam a sua ação na glândula mamária (Kleinberg, Wood, Furth & Lee, 2009).

Recentemente foi demonstrada uma forte correlação entre os níveis de progesterona e de GH, em homogeneizados de tecidos mamários tumorais caninos (Queiroga et al., 2008), e ainda que as concentrações séricas de IGF-1 em cadelas com tumores mamários malignos são significativamente superiores do que em animais saudáveis (Queiroga et al., 2010). Estes achados reforçam a teoria de que o eixo GH/IGF-1 apresenta um papel revelante no desenvolvimento dos tumores mamários na cadela, tendo sido verificado, inclusivamente, que as concentrações séricas e tecidulares pré-cirúrgicas de GH e de IGF-1 estão relacionadas com tempos de sobrevida menores pós a excisão cirúrgica dos tumores mamários malignos (Queiroga et al., 2010a).

III.2.3 - Outros fatores

III.2.3.1 – Dieta

Também a obesidade e a dieta constituem fatores predisponentes no desenvolvimento tumoral. Em 1991, foi realizado um estudo com o intuito de investigar a associação da dieta, com a conformação corporal e o risco de desenvolvimento de tumores mamários, no qual se concluiu que animais esterilizados e que mostravam uma conformação magra entre os 9 e os 12 meses de idade, tinham risco inferior de virem a desenvolver este tipo de tumores (Sonnenschein, Glickman, Goldschmidt & Mckee, 1991). Um outro estudo reportou conclusões idênticas, tendo-se demonstrado que a obesidade em animais com cerca de 1 ano de idade, aumenta consideravelmente o risco de tumores mamários benignos ou malignos, independentemente do estatuto reprodutivo do animal (Pérez-Alenza, Rutteman, Peña, Beynen & Cuesta, 1998). Ainda neste último estudo foi possível concluir que os animais alimentados com comida caseira, tinham maior risco de desenvolver neoplasias quando comparados com animais alimentados com dieta comercial. De facto, animais

alimentados com grandes quantidades de carne vermelha (vaca e/ou porco) e baixa ingestão de frango, apresentaram maior risco de aparecimento de tumores (Pérez-Alenza et al., 1998).

III.2.3.2 – Viral

Alguns autores admitem que existem hipóteses de um possível envolvimento viral na etiologia das neoplasias mamárias, sendo mesmo colocada a hipótese de se poder tratar de uma zoonose. Em ratos de laboratório, sabe-se que a causa etiológica mais comum de tumores mamários é um retrovírus oncogénico (MMTV- vírus de tumor mamário murino), e, alguns estudos na mulher permitiram isolar sequências nucleotídicas a partir de tumores mamários, bastante semelhantes ao vírus responsável pela afeção nos ratos (Szabo, Haislip & Garry, 2005).

Num estudo mais recente detetou-se este vírus em amostras de tumores mamários caninos e felinos, sendo que, no caso das cadelas, a percentagem de tumores positivos foi de 3,49% (3/86), e nos felinos foi 18,6% (16/86), salientando-se que também houve deteção destas mesmas sequências nucleotídicas em glândula mamária normal de ambas as espécies (Hsu et al., 2010). Estes resultados poderão indicar que, numa baixa percentagem de tumores, a etiologia viral pode, de facto, ser admitida, especulando-se sobre uma possível transmissão entre animais e o homem, característica de uma zoonose.

III.2.3.3 – COX-2

Até à data, existem vários estudos que indicam o envolvimento das COX-2 na carcinogénese, tendo já sido largamente descrita a sua importância em tumores mamários de várias espécies tais como na mulher, na cadela e na gata.

Sendo a COX-2 a base desta dissertação, a sua natureza e importância serão descritas detalhadamente mais à frente.

III.3 - Apresentação clínica

A maioria das cadelas com tumores mamários apresenta-se à consulta com nódulos, por vezes múltiplos, localizados maioritariamente nas glândulas mamárias mais caudais (Peleteiro, 1994; Sorenmo, Rasotto, Zappulli & Goldschmidt, 2010). Com efeito, cerca de 65% a 70% dos tumores surgem nas glândulas mamárias dos pares 4 e 5 devido,

provavelmente, ao maior volume de tecido mamário presente (Lana, Rutteman & Withrow, 2007).

Os achados clínicos dependem do comportamento biológico e estadio em que o tumor se encontra aquando da consulta, podendo este apresentar dimensão variável, ser fixo ou móvel, ulcerado ou não, haver presença ou não de linfadenomegália e, mais raramente, revelar sinais de metástases à distância (Sorenmo et al., 2010).

Os tumores mamários benignos estão, normalmente, associados a nódulos de pequenas dimensões, bem circunscritos e firmes à palpação. Já os tumores malignos apresentam geralmente crescimento rápido, invasão, e fixação à pele e tecidos vizinhos, ulceração ou inflamação (Sorenmo et al., 2010).

O carcinoma inflamatório possui uma apresentação clínica única. Este carcinoma é extremamente agressivo, sendo caracterizado pela extensa invasão dos vasos linfáticos da derme e consequente exuberante resposta inflamatória. Este tumor apresenta crescimento rápido, afetando múltiplas glândulas mamárias, assim como a pele envolvente, o que por vezes, pode levar a dificuldades no diagnóstico diferencial pela apresentação clínica similar a outras patologias como as mastites. Os animais com carcinoma inflamatório apresentam edema difuso, espessamento da pele, eritema e sinais de dor, assim como sinais sistémicos, nomeadamente fraqueza, anorexia e perda de peso. É de salientar o seu mau prognóstico, associado à reduzida possibilidade de recorrer à cirurgia devido a extensa invasão local e metástases, optando-se geralmente apenas pelo tratamento paliativo, com tempos de sobrevida curtos (Lana et al., 2007; Sorenmo et al., 2010).

Como referido anteriormente, a maioria dos animais afetados apresentam mais do que um tumor simultaneamente, podendo estes ter dimensões e tipos histológicos distintos. Um estudo realizado, em 2009, por Sorenmo e seus colegas, permitiu concluir que os tumores de pequenas dimensões, inicialmente benignos, podem crescer e evoluir para a malignidade. Adicionalmente mostrou-se que tumores benignos de determinado tipo histológico podem dar origem, após longos períodos de tempo, a carcinomas de igual tipo histológico, sugerindo a teoria de que nos tumores mamários caninos existe um processo histológico contínuo, em que o carcinoma corresponde à última fase (Sorenmo et al., 2009).

Neste mesmo estudo, observou-se ainda que as cadelas que apresentavam carcinomas *in situ* e outros tumores malignos, tinham maior probabilidade de desenvolver novos tumores noutras glândulas mamárias quando comparadas com animais portadores de tumores benignos (Sorenmo et al., 2009), existindo também evidência de progressão de tumores malignos menos agressivos para tumores menos diferenciados como, por exemplo, os carcinomas anaplásicos (Benjamin, Lee & Saunders, 1999).

III.4 - Diagnóstico e estadiamento

Após o aparecimento de uma massa numa glândula mamária, é essencial que seja feita uma investigação clínica minuciosa para, deste modo, se proceder ao diagnóstico diferencial, a fim de descartar outros quadros lesionais com apresentação semelhante como as mamites e a hipertrofia reacional dos linfonodos regionais (Peleteiro, 1994).

O primeiro passo é o diagnóstico clínico, pelo que a existência de uma história pregressa detalhada é muito importante. Para tal deve ser questionado ao proprietário: quando surgiu a lesão, qual a velocidade de crescimento, se apresenta prurido ou secreção, assim como dados relativos aos ciclos éstricos (Peleteiro, 1994).

Através da palpação é possível detetar nódulos quando estes já apresentam 0,2 cm de diâmetro (comunicação pessoal, Peleteiro, 2013). A saída de secreção deve também ser avaliada espremendo delicadamente os mamilos (Peleteiro, 1994). O exame físico deve incluir palpação dos linfonodos regionais (axilares e inguinais) para avaliar a sua dimensão, assim como a realização de radiografia torácica de modo a investigar a possível presença de metástases pulmonares, bastante comuns nestas neoplasias (Peleteiro, 1994; Lana et al., 2007). A utilização da ecografia abdominal pode também ser vantajosa na pesquisa de metástases numa fase precoce, na deteção de hipertrofia dos linfonodos superficiais inguinais e ílico médio, assim como para avaliação de outros órgãos onde as metástases podem ocorrer, tais como, no fígado, rins, baço e supra-renais (Dobson & Lascelles, 2011).

Através dos dados recolhidos no exame clínico, deve-se realizar o estadiamento clínico do tumor, sendo este conhecimento imprescindível para uma correta ponderação de qual a terapêutica a instituir. Para a determinação do estadiamento tumoral é utilizado o sistema TNM (Tumor; Linfonodo; Metástases), originalmente proposto pela Organização Mundial de Saúde em 1980 (Owen, 1980) e modificado por Rutteman, Withrow e MacEwen em 2001 (Tabela 1).

O diagnóstico histopatológico realizado a partir do tumor retirado cirurgicamente, ou através de biópsia, constitui um passo fundamental na correta caracterização da lesão tumoral.

Nas lesões neoplásicas de mama, o diagnóstico citológico apresenta algumas limitações, nomeadamente, no que diz respeito à avaliação do grau de infiltração e da existência de invasão vascular, comparativamente ao diagnóstico histopatológico. Existe, no entanto, uma forte correlação entre o diagnóstico citológico e o histopatológico quando se pretende fazer a distinção entre uma lesão neoplásica e uma lesão inflamatória, havendo uma menor correlação na diferenciação de lesões benignas ou quísticas, devido à escassez celular das primeiras e à abundância de líquido nas últimas.

Deste modo o diagnóstico citológico deve realizar-se nos seguintes casos: dúvidas na natureza das lesões (por exemplo, lesões difusas ou carcinomas inflamatórios inextirpáveis); localização da lesão fora do comum; se há suspeita de recorrência; se existe hipertrofia dos

linfonodos tributários e nos casos em que a eutanásia do animal está em aberto (Peleteiro et al., 2011).

Tabela 1 - Sistema modificado de estadiamento de tumores mamários caninos (segundo Lana et al., 2007)

<u>T – Tumor primário</u> T1 < 3cm de diâmetro máximo T2 3-5 cm de diâmetro máximo T3 > 5 cm de diâmetro máximo			
<u>N – Linfonodos regionais</u> N0 Histologia ou citologia – sem metástases N1 Histologia ou citologia – presença de metástases			
<u>M – Metástases à distância</u> M0 Sem metástases à distância detetadas M1 Com metástases à distância detetadas			
<u>Estádios</u>			
I:	T1	N0	M0
II:	T2	N0	M0
III:	T3	N0	M0
IV:	Qualquer T	N1	M0
V:	Qualquer T	Qualquer N	M1

III.5 - Classificação histológica de tumores mamários caninos

Até à data, foram publicadas três classificações histológicas internacionais de tumores mamários caninos. A primeira em 1974 (Hampe & Misdorp, 1974), posteriormente modificada em 1999 por Misdorp, Else, Hellmen, e Lipscomb. A mais recente classificação internacional foi proposta em 2010 (Tabela 2) (Goldschmidt, Peña, Rasotto & Zappulli, 2011).

Esta última classificação surgiu com o intuito de introduzir alguns subtipos histológicos não incluídos na classificação de 1999. Algumas das alterações apresentadas passaram pela introdução do carcinoma cribiforme e do comedocarcinoma como entidades específicas, contrariamente à anterior classificação que incluía estes dois tipos histológicos dentro do grupo dos carcinomas *in situ*. Adicionalmente, foram incluídas variantes malignas de

algumas neoplasias anteriormente descritas como benignas, nomeadamente, o carcinoma ductal como variante maligna do adenoma ductal que era anteriormente classificado como adenoma basalóide; também o carcinoma intraductal papilar como variante maligna do adenoma intraductal papilar, antes descrito como papiloma ductal, foi ainda introduzido o carcinoma inflamatório e integrado na categoria das neoplasias epiteliais malignas de tipo especial. Os novos tipos histológicos que são mencionados na mais recente classificação são o carcinoma micropapilar e o mioepitelioma maligno, caracterizados em maior detalhe por marcadores de imunohistoquímica para células epiteliais (citoqueratinas 7, 8, 18, 19) e mioepiteliais (citoqueratina 5, 6, 14, 17; actina de músculo liso; vimentina; p63 e calponina (Goldschmidt et al., 2011).

Tabela 2 - Nova classificação histológica de tumores mamários caninos: 2010 (segundo Goldschmidt et al., 2011)

<p><u>1:Neoplasias epiteliais malignas</u></p> <p>Carcinoma <i>in-situ</i> Carcinoma simples <ul style="list-style-type: none"> • Tubular • Tubulo-papilífero • Quístico-papilar • Cribriforme Carcinoma micropapilar invasivo Carcinoma sólido Comedocarcinoma Carcinoma anaplásico Carcinoma em adenoma complexo/Tumor misto Carcinoma tipo complexo Carcinoma tipo misto Carcinoma ductal</p>	<p><u>2:Neoplasias malignas epiteliais – tipos especiais</u></p> <p>Carcinoma de células escamosas Carcinoma adenoescamoso Carcinoma mucinoso Carcinoma rico em lípidos Carcinoma de células fusiformes <ul style="list-style-type: none"> • Mioepitelioma maligno • Carcinoma de células escamosas – variante de células fusiformes • Carcinoma de células fusiformes Carcinoma inflamatório</p>
<p><u>3:Neoplasias malignas mesenquimais – sarcomas</u></p> <p>Osteossarcoma Condrossarcoma Fibrossarcoma Hemangiossarcoma Outros sarcomas</p>	<p><u>4:Carcinossarcoma - tumor mamário misto maligno</u></p>
<p><u>5:Neoplasias benignas</u></p> <p>Adenoma simples Adenoma papilar intraductal Adenoma ductal <ul style="list-style-type: none"> • Com diferenciação escamosa • Fibroadenoma • Mioepitelioma • Adenoma complexo • Tumor misto benigno </p>	<p><u>6:Hiperplasia/Displasia</u></p> <p>Ectasia ductal Hiperplasia lobular (adenose) <ul style="list-style-type: none"> • Regular • Com atividade secretora • Com fibrose interlobular • Com atipia Epiteliomose Papilomatose Alteração fibroadenomatosa Ginecomastia</p>

Tabela 2 - continuação

<u>7:Neoplasias do mamilo</u>	<u>8:Hiperplasia/displasia do mamilo</u>
Adenoma	Melanose da pele do mamilo
Carcinoma	
Carcinoma com infiltração epidérmica (doença de Paget)	

III.6 - Abordagem terapêutica

III.6.1 – Cirurgia

O tratamento de primeira escolha nos tumores mamários é a cirurgia, à exceção dos carcinomas inflamatórios ou nos casos que existem metástases à distância (Lana et al., 2007). A excisão permite o diagnóstico histológico, melhora a qualidade de vida, e altera a progressão da doença, podendo mesmo ser curativa (Fossum, 2007; Queiroga & Lopes, 2002).

O tipo de cirurgia a ser realizada depende da extensão da lesão e da experiência do cirurgião, podendo ser realizada uma excisão local, apenas do(s) nódulo(s) (nodulectomia), da(s) glândula(s), ou uma mastectomia radical com remoção completa de uma ou de ambas as cadeias mamárias e respetivos linfonodos (opcional). A sobrevida não é influenciada pela técnica utilizada, desde que todo o tecido tumoral seja removido e a margem de segurança respeitada, podendo esta variar entre 1cm (Fossum, 2007) a 2cm (Queiroga & Lopes, 2002) em torno do tumor. De salientar que, no caso de animais com várias neoplasias em glândulas e/ou cadeias diferentes, é de extrema importância que todos os tumores sejam removidos e submetidos a diagnóstico histológico, pois, como foi referido acima, podem ser de tipos histológicos diferentes, eventualmente alguns malignos e outros benignos (Fossum, 2007; Queiroga & Lopes, 2002).

A nodulectomia está indicada para tumores inferiores a 0,5 cm, firmes, superficiais, sem fixação, que são normalmente benignos, enquanto a mamectomia ou mastectomia simples, que corresponde a remoção da glândula afetada, está indicada para lesões localizadas centralmente na glândula, com diâmetro maior que 1 cm e demonstrando aderência à pele ou à fáscia (Lana et al., 2007).

A mastectomia regional consiste na extirpação da glândula afetada e das adjacentes. Esta técnica é selecionada quando surgem múltiplos tumores em glândulas adjacentes na mesma cadeia ou quando surgem tumores entre duas glândulas.

Em animais com tumores múltiplos em que várias glândulas de uma mesma cadeia mamária estão afetadas, deve optar-se pela mastectomia total ou regional, devido à possível metastização pela complexa rede linfática. Quando é necessário proceder à mastectomia total bilateral, esta deve ser efetuada em dois tempos operatórios, espaçados entre 3 e 4 semanas, uma vez que assim a cicatrização será mais fácil e menos complicações pós-cirúrgicas são descritas (Queiroga & Lopes, 2002).

Aquando da ressecção das glândulas mamárias caudais, através de mastectomia regional ou total, os linfonodos inguinais superficiais devem ser removidos pois, anatomicamente, encontram-se associados a estas glândulas, havendo a possibilidade de existirem células tumorais nos vasos linfáticos ou mesmo nos linfonodos inguinais. Relativamente aos linfonodos axilares, estes só devem ser removidos em caso de suspeitas ou do diagnóstico citológico ser indicativo da existência de metástases (Misdorp, 2002).

Conjuntamente com a nodulectomia ou mastectomia, pode ser realizada a ovariectomia tendo em consideração que a última deve ser realizada em primeiro lugar, de modo a evitar a entrada de células tumorais na cavidade abdominal. A realização da ovariectomia, embora não previna o desenvolvimento de tumores mamários no futuro, elimina a influência hormonal do ovário sobre o tecido mamário remanescente, incluindo tumores não detetados (Fossum, 2007).

III.6.2 – Quimioterapia e radioterapia

Em mulheres com cancro de mama a quimioterapia é o tratamento mais utilizado. Já nos tumores mamários de cadela pouco se sabe relativamente à eficácia desta opção terapêutica (Lana et al., 2007). São poucos os estudos realizados sobre a utilização destes fármacos em tumores mamários caninos, existindo um estudo que refere a sensibilidade das células de carcinoma mamário canino à doxorrubicina *in vitro* (Sartin, Barnes, Toivio-Kinnucan, Wright & Wolfe, 1993). Num outro estudo, numa amostra de 16 animais foi testada a utilização de ciclofosfamida e do fluoracil após a cirurgia, em metade dos animais da amostra, enquanto que a outra metade foi apenas sujeita a cirurgia. Os resultados demonstraram aumento do tempo livre de doença e do tempo de sobrevivência nos animais submetidos a quimioterapia (Karayannopoulou, Kaldrymidou, Constantinidis & Dessiris, 2001). Um estudo muito recente refere a utilização de carboplatina como terapia adjuvante nestes tumores em cadela, revelando resultados positivos (Lavalle, De Campos, Bertagnolli, & Cassali, 2012).

Para além dos quimioterápicos tradicionais, tem vindo a ser sugerida a utilização de inibidores da COX-2 tanto nos tumores mamários da mulher como da cadela, havendo vários estudos em medicina humana e alguns em medicina veterinária que lhes assinalam

alguma eficácia terapêutica e preventiva neste tipo de neoplasias. A relevância dos inibidores da COX-2 será descrita mais aprofundadamente, mais à frente.

Tal como a quimioterapia, também na radioterapia não existe informação relevante quanto à eficácia da sua utilização. Sabe-se, no entanto, que estará reservada a pacientes cuja remoção cirúrgica da neoplasia não seja possível ou possa ser apenas incompleta. Percebe-se então que são necessários mais estudos no âmbito dos tumores mamários caninos, de modo a averiguar a utilidade e eficácia destas duas opções terapêuticas (Lana et al., 2007).

III.6.3 – Imunoterapia

A imunoterapia tem sido descrita como uma modalidade terapêutica promissora em cadelas com tumores mamários. Num estudo em que foi utilizado um vírus oncolítico (GLV-1h68), em tumores mamários de cadela, foi possível verificar que o vírus infectou e destruiu com sucesso linhas celulares de carcinoma mamário canino, inibiu a proliferação tumoral, reduziu o tamanho da neoplasia e replicou-se em xenotransplante (Gentschev et al., 2009).

Um outro grupo de investigadores testou uma vacina autóloga de fusão com células dendríticas-células tumorais mamárias, concluindo que a sua administração nos linfonodos poplíteos de canídeos saudáveis conduziu à produção significativa de IgG, imunoglobulinas estas que revelaram reconhecer antígenos de células tumorais *in vitro* (Bird et al., 2011).

III.6.4 – Terapia hormonal

No que diz respeito à terapia hormonal, é consensual que a realização precoce de ovariectomia tem efeitos preventivos no desenvolvimento destas neoplasias. Já o benefício da sua utilização como terapêutica adjuvante em tumores mamários, não está ainda bem definido. Existem, no entanto, evidências de que poderá ter efeitos positivos, nomeadamente, o aumento do tempo de sobrevivência pós-cirúrgica, como já referido anteriormente (Sorenmo et al., 2000; Lana et al., 2007).

A utilização de inibidores seletivos dos recetores de estrogénio como o tamoxifeno tem vindo a ser estudada, tendo sido testada a sua ação anti-proliferativa tanto *in vitro*, como em alguns ensaios clínicos (Lana et al., 2007). No entanto, os animais tratados tem mostrado efeitos secundários significativos como: piómetra, edema vulvar, corrimento vaginal, incontinência, sinais de estro e infecções do tracto urinário (Morris, Dobson & Bostock, 1993). Num estudo recente, realizado com o intuito de avaliar os efeitos secundários da terapêutica com tamoxifeno, concluiu-se que este fármaco pode ser uma mais-valia como adjuvante terapêutico em cadelas com tumores mamários, desde que os efeitos secundários

sejam bem avaliados e controlados. Devido ao risco de piómetra, recomenda-se que esta terapêutica seja aplicada apenas a animais esterilizados (Tavares et al., 2010).

III.7 - Prognóstico

Os fatores apontados como mais relevantes no prognóstico dos tumores mamários caninos são: tamanho tumoral, envolvimento dos linfonodos, presença de metástases à distância, tipo histológico, grau de malignidade, grau de diferenciação nuclear, infiltração celular linfóide nos tecidos vizinhos, grau de invasão, permeação vascular por células neoplásicas, presença de recetores esteróides, aneuploidia do ADN, número de células em fase S e o número de Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas (AgNORs) (Lana et al., 2007).

III.7.1 – Tamanho tumoral

Apesar da importância do tamanho tumoral no prognóstico ser consensual, existe ainda algum desacordo relativamente ao tamanho a partir do qual o prognóstico se torna significativamente pior.

Alguns estudos sugerem que os tumores com um diâmetro <3cm (classificados como T₁ de acordo com sistema TMN) apresentam menor probabilidade de recorrência e maior tempo de sobrevivência, apontando aos tumores classificados como T₂ (3-5cm) e T₃ (> 5cm), um pior prognóstico (Kurzman & Gilbertson, 1986; Philibert et al., 2003; Matos, 2007).

Um outro estudo permitiu concluir que as cadelas com tumores > 5cm tinham um prognóstico significativamente pior do que animais com tumores de diâmetro <5cm (Chang et al., 2005). É contudo importante salientar que existem tipos tumorais onde o tamanho pode não ser tão facilmente associável ao prognóstico, nomeadamente o carcinoma de tipo misto, onde a componente maligna poderá ser bastante diferente dos tumores de tamanho inferior, podendo estes últimos ter um maior número de células malignas, e ainda os carcinomas quísticos onde as células tumorais correspondem apenas a uma parte da massa tumoral mensurável (Matos, 2007).

Apesar destas discrepâncias que podem interferir com a relevância do tamanho como fator de prognóstico, a aceitação deste é unânime, existindo vários estudos a referirem a utilidade de um sistema de estadiamento baseado na dimensão tumoral (Sorensen et al., 2010).

III.7.2 – Envolvimento dos linfonodos

Alguns estudos referem o envolvimento dos linfonodos como sendo um fator de prognóstico importante (Misdorp et al., 1999; Matos, Faustino, Lopes, Rutteman & Gärtner, 2006),

enquanto outros trabalhos consideram que este fator não afeta o prognóstico (Schneider et al., 1969; Nieto et al., 2000). Porém, estas diferenças podem dever-se ao facto dos estudos serem maioritariamente retrospectivos, e dos procedimentos cirúrgicos e de atribuição do estadio não estarem estandardizados devido a avaliação histológica incompleta dos linfonodos, aos diferentes métodos de preparação e de coloração dos tecidos, assim como, aos diferentes métodos de análise estatística (Matos et al., 2006; Sorenmo et al., 2010).

Através do exame de citologia ou de histopatologia é possível verificar se existe ou não envolvimento dos linfonodos. Em caso positivo, o tumor deverá ser classificado como N₁ de acordo com o sistema TNM modificado e ser-lhe-á atribuído um estadio IV, o penúltimo de acordo com esta classificação (Rutteman et al., 2001). A utilização de imunohistoquímica para detecção de citoqueratinas demonstrou também ser um método útil na identificação de micrometástases ocultas, em especial quando estas não são detetadas pela coloração de hematoxilina-eosina (Matos et al., 2006).

III.7.3 – Metástases à distância

Relativamente aos locais de metastização dos tumores mamários, sabe-se que estas neoplasias metastizam, principalmente, nos linfonodos regionais, pulmões e, menos frequentemente, no fígado, baço, rins, pele, osso, encéfalo, glândulas adrenais e coração (Peleteiro, 1994; Fossum, 2007). A presença de metástases à distância aquando do diagnóstico implica um mau prognóstico, havendo um estudo que concluiu que a sobrevivência pós-operatória média em animais com metástases foi de 5 meses, o que é um período bastante inferior, comparativamente, aos 28 meses de vida verificados nos animais sem metástases (Philibert et al., 2003).

III.7.4 – Invasão tecidular e vascular

Também a invasão tecidular (pele e tecidos vizinhos) e a invasão dos vasos sanguíneos por células tumorais constituem importantes fatores de prognóstico. Um estudo realizado em cães de raça Beagle, permitiu concluir que estes dois fatores têm grande relevância na caracterização do comportamento maligno dos tumores mamários caninos (Chrisp & Spangler, 1980).

III.7.5 – Grau de diferenciação nuclear

O grau de diferenciação nuclear (classificado como baixo, moderado ou bem diferenciado) constitui outro importante fator de prognóstico. Num estudo onde foi avaliada a possibilidade de recidiva tumoral e formação de metástases durante 2 anos após mastectomia, foi possível concluir que os animais com tumores em que o grau de diferenciação nuclear é baixo, este risco é de 90%, enquanto nos classificados como moderadamente diferenciados é de 68%, e nos bem diferenciados de apenas 24% (Gilberston, Kurzman, Zachrau, Hurvitz & Black, 1983).

III.7.6 – Tipo histológico

O tipo histológico é também um fator cuja importância no prognóstico é bastante reconhecido, sendo os sarcomas o tipo histológico com pior prognóstico, conduzindo à morte da maioria dos animais entre os 9 e os 12 meses (Misdorp, Cotchin & Hampe, 1971; Heelmén, Bergstrom & Holmberg, 1993).

Dentro dos carcinomas, o subtipo histológico demonstra também diferenças significativas no tempo de sobrevivência; um estudo com 99 animais concluiu que o carcinoma anaplásico possui o pior prognóstico, com um tempo de sobrevida médio após a cirurgia de 2,5 meses, comparativamente aos adenocarcinomas em que a média de sobrevida estimada foi de 21 meses; nos carcinomas sólidos a média foi 16 meses e nos outros tipos histológicos de 24 meses (Philibert et al., 2003).

A diferenciação histológica de um tumor é também muito importante, sendo tanto melhor o seu prognóstico quanto mais elevado for o seu grau de diferenciação, uma vez que as neoplasias pouco diferenciadas perdem dependência hormonal tornando-se, portanto, mais agressivas (Moore, 2006).

A evolução para carcinoma inflamatório associado a qualquer um dos tipos histológicos resulta num prognóstico muito reservado, ocorrendo a morte do animal num curto espaço de tempo (cerca de um mês) (Bergman, 2007; Veterinary Society of Surgical Oncology, VSSO, 2008). Isto deve-se ao facto de 96% dos carcinomas inflamatórios possuírem metástases regionais e 32% metástases à distância no momento do diagnóstico, passando para 100% com metástases regionais e 62% com metástases à distância no momento da eutanásia (VSSO, 2008).

III.7.7 – Grau de malignidade

O grau de malignidade é também um fator significativo no prognóstico dos tumores mamários caninos (Gilbertson et al., 1983; Misdorp et al., 1999).

O método de atribuição de grau de malignidade mais frequentemente utilizado na avaliação do cancro da mama em mulher é o método “Elston e Ellis” (1991), correspondendo à mais recente modificação do método “Bloom e Richardson” (Bloom & Richardson, 1957).

Foram propostos por Gilbertson (1983), Lagadic e Estrada (1990), Misdorp (2002) e (Clemente et al., 2010) sistemas para a classificação do grau de malignidade em tumores mamários caninos, baseados nos já descritos em medicina humana (Bloom & Richardson, 1957; Elston & Ellis, 1991). Estes sistemas baseiam-se numa combinação de fatores celulares (predominantemente nucleares) nomeadamente: na quantificação do nível de anaplasia, na percentagem de formações tubulares, na atividade mitótica, e no pleomorfismo nuclear. Após a soma do valor atribuído para cada fator analisado, é obtido o grau de malignidade tumoral (tabelas 3 e 4) (Misdorp, 2002).

Os sistemas propostos recentemente para a classificação dos tumores mamários caninos (Misdorp, 2002; Clemente et al., 2010) apresentam algumas diferenças subtis (Tabela 3), tais como, a denominação de intermédio vs moderadamente diferenciado atribuída aos tumores de grau II. No entanto, as possíveis implicações destas pequenas diferenças em termos de prognóstico não foram ainda identificadas (Goldschmidt et al., 2011).

Tabela 3 - Critérios histológicos para atribuição do grau de malignidade (segundo Goldschmidt et al., 2011).

PONTUAÇÃO	FORMAÇÃO TUBULAR	PLEOMORFISMO NUCLEAR	MITOSSES OU HIPERCROMATISMO NUCLEAR POR CGA
1 PONTO			
Clemente et al., 2010	Formações tubulares em > 75% do tumor	Núcleos uniformes ou pequenos e regulares e, ocasionalmente, nucléolo	0-9 mitoses /10 CGA
Misdorp, 2002	Formações tubulares bem marcadas	Discreta heterogeneidade na forma e coloração nuclear	Aparecimento ocasional de núcleos hipercromáticos ou mitoses por CGA
2 PONTOS			
Clemente et al., 2010	Organização tubular moderada (10-75% do tumor), em conjunto com áreas de crescimento tumoral sólido	Grau moderado de variação no tamanho e forma nuclear, núcleo hipercromático, presença de nucléolo (alguns dos quais proeminentes)	10-19 mitoses/10 CGA

Tabela 3 - (continuação)

Misdorp, 2002	Formação moderada de túbulos	Moderada heterogeneidade na forma e coloração nuclear	2-3 núcleos hipercromáticos ou mitoses por CGA
3 PONTOS			
Clemente et al., 2010	Formação tubular mínima ou inexistente (<10%)	Variação marcada no tamanho nuclear, núcleo hipercromático, por vezes com um ou mais nucléolos proeminentes	>20 mitoses /10 CGA
Misdorp, 2002	Poucos ou nenhuns túbulos	Marcada heterogeneidade na forma e coloração nuclear	2-3 núcleos hipercromáticos ou mitoses por CGA

Legenda: CGA – Campo em grande ampliação

Tabela 4 - Grau de malignidade de neoplasias (segundo Goldschmidt et al., 2011)

Pontuação total	Grau de malignidade
3 a 5	
Clemente et al., 2010	I (baixo)
Misdorp, 2002	Bem diferenciado
6 a 7	
Clemente et al., 2010	II (intermédio)
Misdorp, 2002	Moderadamente diferenciado
8 a 9	
Clemente et al., 2010	III (alto)
Misdorp, 2002	Fracamente diferenciado

Estudos recentes vieram confirmar o que tinha sido publicado num estudo realizado, em 2005, por Karayannopoulou e seus colegas, as diferenças significativas encontradas no prognóstico foram relacionadas com o grau de malignidade tumoral, tendo-se concluído que os animais com tumores de grau III tinham um tempo de sobrevivência menor comparativamente aos animais portadores de tumores de grau I ou II (Karayannopoulou, Kaldrymidou, Constantinidis & Dessiris, 2005).

III.7.8 – Infiltração celular linfóide

Outro fator que foi indicado como relevante no prognóstico destas neoplasias é a infiltração celular linfóide. Esta resposta indica uma atividade imune anti-tumoral, estando a sua presença associada a menores taxas de recorrência pós-cirúrgica (Gilbertson et al., 1983). Contudo, estes dados não foram confirmados por estudos subsequentes (Matos, 2007).

III.7.9 – Aneuploidia e células em fase S

Numa amostra de 136 animais com tumores mamários, aos quais foi feito o respetivo acompanhamento, foi possível verificar que tanto a presença de aneuploidia como o alto índice de células em fase S está associada a tempo de sobrevivência menor (Hellmén et al., 1993).

III.7.10 – AGNOR - Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas

O marcador de proliferação (Agyrophilic nucleolar organizer regions, AGNOR), Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas está também implicado no prognóstico dos tumores mamários caninos. O seu aumento está presente particularmente em tumores de comportamento maligno (em especial com invasão dos tecidos vizinhos) e associado a tempos de sobrevida pós-cirúrgica menores (Bostock, Moriarty & Crocker, 1992; Sorenmo et al., 2010).

III.8 - Carcinogénese mamária canina: marcadores moleculares

Através da investigação efetuada, principalmente, em humanos e em animais de laboratório já foi possível identificar um grande número de moléculas envolvidas nos processos neoplásicos.

No que diz respeito aos tumores caninos pouco é conhecido relativamente aos mecanismos e moléculas envolvidas no processo de carcinogénese. O argumento de que os tumores mamários caninos podem vir a ser um bom modelo de estudo para o cancro de mama na mulher, fomentou o interesse e o número de estudos nesta espécie, de modo a melhor averiguar as semelhanças e diferenças entre as duas espécies.

Dos muitos marcadores envolvidos no cancro da mama salientam-se, de seguida, alguns, sobre os quais já há evidências da sua participação em neoplasias mamárias caninas.

III.8.1 – p53

O *p53* é um gene supressor tumoral, cuja função é controlar o crescimento celular após terem ocorrido alterações no ADN. Mutações neste gene poderão originar proliferação

celular desregulada, o que pode levar, conseqüentemente, à formação de neoplasias e/ou ao favorecimento do seu crescimento/progressão (Velculescu & El-Deiry, 1996).

Tanto na mulher como na cadela, a sobreexpressão da proteína p53 mutante parece estar associada a um pior prognóstico, estando correlacionada com um tempo de sobrevivência menor (Kim et al., 2010; Lee et al., 2004). A frequência de mutações neste gene, em carcinomas mamários caninos, é de 20%, valor semelhante ao observado na mulher (Lee et al., 2004).

Um estudo acerca deste gene verificou a perda de um alelo e a mutação de outro em três das nove linhas celulares de tumores mamários caninos analisados. Foram também identificadas as mesmas mutações em 2 de 3 tumores mamários que deram origem às linhas celulares, não sendo observada nenhuma mutação no tecido mamário normal (Misdorp, 2002).

Estudos revelaram que 3 em cada 10 (Chu et al., 1998) e que 6 em cada 40 (Veldhoen, Watterson, Brash & Milner 1999) tumores mamários caninos primários, mostram mutações no gene *p53* que aumentam o risco de recidiva e de morte (Wakui et al., 2001).

III.8.2 – p63

O gene *p63* pertence à família do gene anterior e está envolvido na regeneração de células estaminais epiteliais. Tal como no p53 as mutações germinativas no gene p63 têm vindo a ser associadas a várias alterações do desenvolvimento do tecido mamário (Yang et al., 1998; Yang et al., 1999). Nos tumores mamários, tanto da espécie humana como da canina, está demonstrada a alta sensibilidade e especificidade da imunodeteção da p63, na identificação de células mioepiteliais constituindo um útil marcador de diagnóstico, permitindo distinguir as células basais ou mioepiteliais dos miofibroblastos (Gama, Alves, Gartner & Schmitt, 2003; Matos, Dufloth, Alvarenga, Zeferino & Schmitt, 2005).

Num dos estudos em que foi avaliada a expressão deste gene em tumores mamários caninos, uma possível relação entre as células estaminais e mioepiteliais foi sugerida, pela importância deste gene no desenvolvimento e manutenção das células estaminais, e pela sua expressão ao nível das células mioepiteliais, podendo este facto ajudar no entendimento da histogénese das neoplasias mamárias caninas (Gama et al., 2003).

III.8.3 – Ki-67 e PCNA

O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear, ativamente expressa em células replicantes, não estando presente em células quiescentes (Gerdes et al., 1984).

Em humanos, a avaliação imunohistoquímica deste antígeno para averiguar o índice de proliferação celular do tumor mostra-se um bom indicador de prognóstico, em particular, nos casos de recaída do cancro de mama (Railo et al., 1993).

O estudo deste antígeno é, muitas vezes, associado a outros marcadores de proliferação, nomeadamente o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).

Estudos conduzidos em cadelas para avaliar a expressão destes dois marcadores, revelaram uma correlação positiva entre a sobreexpressão de Ki-67 e um mau prognóstico, enquanto os tumores malignos mostraram maior quantidade de PCNA, comparativamente à glândula mamária normal ou hiperplásica e aos tumores benignos (Peña et al., 1998; Funakoshi et al., 2000).

III.8.4 – HER-2

O gene HER-2 (também chamado de c-erbB2 ou neu) codifica um recetor do fator de crescimento epidérmico e, no homem, localiza-se no cromossoma 17. Estudos estatísticos demonstraram que este gene está amplificado em 15-20% das pacientes com cancro de mama, levando esta alteração ao aumento da invasão e formação de metástases, bem como ao aumento da resistência à quimioterapia (Ahn & Vogel, 2012).

Em medicina humana, a identificação da amplificação do HER-2 é utilizada como fator de prognóstico, e como indicador de resultados terapêuticos favoráveis caso fármacos direccionados especificamente para tumores HER-2 positivos venham a ser usados (Ross et al., 2003).

Em medicina veterinária, foi analisada a expressão de HER-2 em 79 tumores mamários caninos, tendo a sua sobreexpressão sido detetada em 50% dos tumores benignos e em 19,1% dos adenocarcinomas (Rungsipipat et al., 1999). Os achados neste estudo foram semelhantes aos encontrados na mulher, sendo a percentagem de tumores malignos com expressão de HER-2 na ordem dos 20 a 30%, tal como no cancro de mama na mulher (Kerns, Pence, Huper, Kinney, & Iglehart, 1990; Ferretti et al., 2007).

À semelhança do que acontece nos humanos, foram encontrados 4 subtipos de tumores mamários caninos, de acordo com os níveis de expressão de HER-2 e dos recetores de estrógenos (ER) avaliados por imunohistoquímica, a saber: tipo luminal A (ER⁺/HER2⁻, 44,8%); tipo luminal B (ER⁺/HER2⁺, 13,5%); tipo basal (ER⁻/HER2⁻, 29,2%) e tipo com sobreexpressão de HER2 (ER⁻/HER2⁺, 8,3%), tendo sido registado um menor tempo de sobrevida nos animais com o tipo basal (Gama, Alves & Schmitt, 2008).

Estudos realizados em tumores de cadelas revelam um prognóstico mais favorável em animais com sobreexpressão de HER-2, sendo o período de sobrevivência maior comparativamente aos animais que apresentam uma expressão normal deste marcador

(Hsu, Huang, Liao, Wong & Chang, 2009; Gama et al., 2008). Mais estudos são necessários com o intuito de averiguar o verdadeiro valor prognóstico deste proto-oncogene na carcinogênese mamária canina.

III.8.5 – EGFR

O recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), também conhecido como HER-1, pertencente à família dos recetores tirosina quinase e, tal como o recetor HER-2, também está implicado na carcinogênese mamária.

Um estudo analisou 136 amostras de tumores mamários caninos, assim como as áreas adjacentes de mama normal e hiperplásica, tendo-se observado uma sobreexpressão de EGFR nas áreas não tumorais, particularmente, nas células mioepiteliais sendo nestes casos as células luminais negativas (Gama et al., 2009). Nos tecidos tumorais foi observada a sobreexpressão de EGFR em 9 tumores benignos (19,6%) e em 38 malignos (42,2%), estando os níveis de EGFR significativamente correlacionados com a malignidade. Também foi detetada uma associação significativa entre este marcador e a idade do animal, e o tamanho do tumor. Ainda neste estudo, a sobreexpressão de EGFR em tumores mamários caninos foi associada com um menor tempo livre de doença, e com um menor tempo de sobrevivência, contudo, sem significado em termos estatísticos (Gama et al., 2009).

III.8.6 – BRCA1 e BRCA2

Os genes supressores tumorais BRCA1 (breast cancer type 1 susceptibility protein) e BRCA2 (breast cancer type 2 susceptibility protein) desempenham um papel importante na manutenção da estabilidade genómica (Davies et al., 2001). Mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 estão na origem de tumores mamários com um forte componente hereditário na mulher (Ford, Easton & Stratton, 1998), tendo já sido inclusivamente verificada a presença destes genes em tumores mamários caninos (em especial na raça Springer Spaniel Inglês), sugerindo o seu envolvimento na carcinogênese destes tumores (Rivera et al., 2009).

III.8.7 – MMPs

As metaloproteinases da matriz (MMPs) constituem uma família de enzimas proteolíticas zinco-dependentes, responsáveis pela degradação dos componentes da matriz. Estas

contribuem na invasão tumoral através da proteólise da matriz extracelular que constitui uma barreira contra a invasão das células tumorais (Woodhouse, Chuaqui & Liotta, 1997).

Nos tumores mamários de cadela, a avaliação da expressão de MMP-9 e da MMP-2 revelou uma maior expressão da MMP-9 nos tumores malignos, sugerindo ter um papel no comportamento agressivo destas neoplasias, e que a sua utilização poderá ser útil como um fator de prognóstico (Hirayama et al., 2002). Um outro trabalho em cadelas, demonstrou que a produção de MMP é maior na periferia do tumor, acentuando o seu possível envolvimento na invasão tumoral (Loukopoulos, Mungall, Straw, Thornton & Robinson, 2003).

III.8.8 – PTEN

Também o gene supressor tumoral homólogo da fosfatase e tensina (PTEN), cujas funções incluem regulação do crescimento, proliferação e apoptose celular, parece desempenhar um papel nestas neoplasias, devido a alterações ou a perda do mesmo. Existe portanto relevância deste gene em termos de prognóstico, estando a sua perda associada a tempos de sobrevivência mais curtos quer na espécie canina quer na humana (Depowski, Rosenthal & Ross, 2001; Ressel, Millanta, Caleri, Innocenti & Poli, 2009).

III.8.9 – Sialyl Lewis x

O antígeno Sialyl Lewis x (sL^x) é considerado um marcador tumoral com implicações funcionais no comportamento maligno das células neoplásicas. A sua sobreexpressão está relacionada com a progressão e o desenvolvimento de metástases em vários tipos de cancro, incluindo o da glândula mamária (Pinho et al., 2007).

Aquando da reação inflamatória, este antígeno promove a ligação dos leucócitos ao endotélio ativado por citocinas, através da molécula de adesão E-selectina. Esta ligação conduz à diapedese dos leucócitos e a sua migração para os tecidos (Munro et al., 1992). Tal como numa inflamação, as células tumorais que expressam sL^x ligam-se à E-selectina das células endoteliais ativadas por citocinas, o que resulta na passagem de células tumorais para os tecidos, levando à formação de uma nova lesão tumoral (Potapenko et al., 2010).

Nos tumores mamários da mulher e da cadela existem evidências da sobreexpressão deste antígeno nas células, assim como da sua associação com a formação de metástases (em especial por via hematogénea) sugerindo que a avaliação deste marcador deve ser considerada como fator de prognóstico (Fukuda, 1996; Nakagawa et al., 2002; Pinho et al., 2007).

III.8.10 – Genes reguladores da apoptose

Genes da via apoptótica estão também envolvidos na carcinogênese mamária, tendo-se verificado o aumento das proteínas supressoras da apoptose (bcl-2, bcl-XI) e uma diminuição das proteínas indutoras da mesma (Bax, caspases 8 e 3), tanto em tumores de mama da mulher como na cadela (Kumaraguruparan, Karunakaran, Balachandran, Manohar & Nagini, 2006).

III.9 - Ciclooxygenases

As ciclooxygenases (também conhecidas como prostaglandinas endoperoxidase sintetases) constituem um grupo de enzimas responsáveis pela síntese de prostaglandinas. Esta biossíntese ocorre através da conversão do ácido araquidônico em prostaglandina G_2 (PGG_2), com posterior redução da PGG_2 em prostaglandina H_2 (PGH_2).

Através da ação das prostaglandinas sintetase específicas, a PGH_2 é convertida em várias moléculas lipídicas ativas incluindo: a PGE_2 (envolvida na inflamação e crescimento tumoral), a PGD_2 (com ação pró- e anti-inflamatória), a PGI_2 (com funções de proteção gástrica e resistência ao tromboembolismo), a $PGF_{2\alpha}$ (envolvida no processo do parto) e os tromboxanos A_2 (TxA_2) que promovem a formação de trombos (Smith, DeWitt & Garavito, 2000; Wang & Dubois, 2006; Zha, Yegnasubramanian, Nelson, Isaacs, & De Marzo, 2004).

Até à data foram identificadas três isoformas reconhecidas da ciclooxygenase. A ciclooxygenase-1 (COX-1) identificada no ano 1970 por John Vane encontra-se expressa numa grande variedade de células e tecidos, estando envolvida em várias funções de manutenção da homeostase, tais como a função renal, manutenção da integridade da mucosa gástrica, estimulação da agregação plaquetária e vasoconstrição. Esta enzima constitui o alvo do ácido acetil salicílico (Aspirina[®]) e de outros anti-inflamatórios não esteróides (Vane, 1971).

No início dos anos noventa foi identificada a ciclooxygenase-2 (COX-2). Ao contrário da anterior, esta isoforma apenas está expressa nos tecidos em determinadas condições, tais como no decorrer de uma inflamação ou no desenvolvimento tumoral. Alguns estudos demonstraram, no entanto, que esta enzima está presente no cérebro, rim, placenta e ovário, desempenhando funções fisiológicas nestes locais (Needleman & Isakson, 1997).

Uma terceira isoforma da ciclooxygenase (COX-3) foi descoberta em 2002, tendo sido identificada a sua presença na espécie canina. Contudo, a sua relevância, tanto nesta espécie como em outras, ainda não foi estabelecida (Chandrasekharan et al., 2002).

III.9.1 - COX-2: papel na carcinogénese

Uma resposta inflamatória controlada é um processo necessário em diversas situações tais como na reparação tecidual, cicatrização, e defesa contra agentes patogénicos. Já uma resposta inflamatória crónica e descontrolada revela-se prejudicial.

Em 1863, foi pela primeira vez proposto o papel da inflamação crónica no desenvolvimento tumoral, quando Rudolf Virchow observou a presença de leucócitos em tecidos neoplásicos, tendo postulado que a inflamação promove um ambiente celular que conduz à iniciação e desenvolvimento carcinogénico (Sethi, Shanmugam, Ramachandran, Kumar & Tergaonkar, 2012).

No microambiente tumoral, uma rede constituída por diversos mediadores pró-inflamatórios, participa num processo complexo de sinalização, que irá possibilitar a metastização de células tumorais através do estroma, promovendo o crescimento tumoral (Sethi et al., 2012). A inflamação crónica atua como reguladora da promoção e progressão tumoral, através da presença de citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigénio (ROS), oncogenes, 5-lipoxigenase (LOX), metaloproteinases da matriz (MMPs) e da ciclooxygenase-2 (COX-2), assim como pela ativação de importantes fatores de transcrição como o NF- κ B (fator nuclear κ B), o STAT-3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3), o AP-1 (ativador de proteína 1), o HIF-1 α (fator indutor de hipoxia 1 α), culminando numa aceleração da proliferação tumoral, evasão à apoptose, aumento da angiogénese e formação de metástases (Sethi et al., 2012).

A sobreexpressão da COX-2 pode ocorrer por intermédio de vários estímulos fisiológicos e pro-inflamatórios, incluindo hormonas, interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF- α), fator de transformação do crescimento (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblastos (bFGF) e lipopolissacarídeos (LPS). Em situações normais esta indução é transitória, retornando aos níveis basais de 24 a 48h (Dubois et al., 1998).

Dos derivados bioactivos da COX-2, a PGE₂ surge como o mais importante na carcinogénese devido às implicações na resposta inflamatória e no crescimento tumoral (Wang & Dubois, 2006).

Vários estudos realizados em medicina humana, em especial no âmbito da polipose adenomatosa familiar (PAF), encontraram evidências concretas do papel da PGE₂ no crescimento tumoral. Num dos estudos que recorreu a um modelo murino (ratos APC^{Min}) foi possível verificar que a PGE₂ promove o crescimento do adenoma intestinal. Num outro estudo, foi possível constatar que o uso de anti-inflamatórios não esteróides induziu a regressão dos adenomas em ratos APC^{Min} (Hansen-Petrik et al., 2002; Wang et al., 2004).

Os níveis celulares de PGE_2 dependem da atividade das sintetases conversoras de PGH_2 em PGE_2 , assim como da presença de 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase (15-PGDH) que promove a degradação e a inativação da PGE_2 (Wang & Dubois, 2006).

A PGE_2 exerce a sua função através da ligação aos seus recetores (EPI-1 a EPI-4), tendo-se verificado que a expressão de determinados recetores está correlacionada com determinados tipos de cancro. Os recetores EPI-1, 2 e 4 parecem ser os mais envolvidos no desenvolvimento do cancro de mama de acordo com ensaios realizados em ratos (Kawamori et al., 2001; Chang et al., 2004; Wang & Dubois, 2006).

Através da ligação aos seus receptores específicos, a PGE_2 parece promover o crescimento tumoral com aumento da proliferação celular e da angiogénese, inibição da apoptose, estimulação da invasão e supressão da resposta imunitária.

Em seguida, irei mencionar sucintamente, quais os alvos ativados pela PGE_2 que culminam nas referidas alterações, resumidas na Figura 1.

Na maioria das neoplasias verifica-se ativação do EGFR, induzida pela PGE_2 , que atua sinergicamente. A PGE_2 inibe a apoptose e estimula a invasão e a proliferação celular pela via PI3quinase/Akt, enquanto a ativação do EGFR irá estimular efeitos celulares semelhantes pela via *Ras* (oncogenes encontrados numa grande variedade de tumores, levando à proliferação, diferenciação e sobrevivência celular) (Dannenberg, Lippman, Mann, Subbaramaiah & Dubois 2005; Wang and Dubois 2006).

Por outro lado, também os recetores ativados pelos proliferadores peroxissomais (PPARs), importantes na regulação do metabolismo celular (em especial de células adiposas), são ativados pela via PI3quinase/Akt promovendo a sobrevivência celular (Wang et al., 2003; Wang et al., 2004).

De acordo com um estudo realizado em células epiteliais de rato, a apoptose é concomitantemente inibida pelo aumento de sobreexpressão de Bcl-2 (família de proteínas reguladoras da morte celular) regulada pela sobreexpressão da COX-2 (Tsuji & Dubois, 1995). Um outro estudo, realizado em células de carcinoma do cólon humano expostas a PGE_2 , revelou um aumento significativo das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, enquanto a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax se manteve sem variação (Sheng, Shao, Morrow, Beauchamp & Dubois, 1998). Estes resultados reforçam a existência de uma relação direta entre a expressão da COX-2 e a inibição da apoptose.

O crescimento de tumores sólidos e a formação de metástases depende da formação de novos vasos sanguíneos. Os principais fatores promotores da angiogénese são VEGF, bFGF e PDGF, estando a COX-2 ligada a produção dos dois primeiros (Méric et al., 2006; Wang & Dubois, 2006). De acordo com os estudos realizados em cancro colo-rectal humano, a sobreexpressão de PGE_2 está relacionada com a produção de VEGF e bFGF, e a administração de AINES induz o bloqueio da produção destes fatores angiogénicos (Tsuji et al., 1998; Sawaoka et al., 1999).

O crescimento tumoral está muitas vezes associado à imunossupressão, uma vez que o microambiente dos tecidos tumorais favorece, frequentemente, a mudança da imunidade mediada por Th1 (linfócitos T helper tipo1) para Th2 (linfócitos T helper tipo 2), representando esta última uma resposta imunossupressora (Wang & Dubois, 2006).

Foi já demonstrado que a PGE₂ inibe as citocinas produzidas na resposta Th1 tal como o fator de necrose tumoral α , o interferon γ e a interleucina 2 (IL-2), e que, pelo contrário, promove a atividade das citocinas pertencentes à resposta Th2, tais como as IL-4, IL-6 e IL-10, sendo esta última uma interleucina imunossupressora. Os efeitos produzidos pela PGE₂ no sistema imunitário poderão, portanto, facilitar a invasão tecidular por células neoplásicas (Della Bella et al., 1997; Harris, Padilla, Koumas, Ray, & Phipps, 2002).

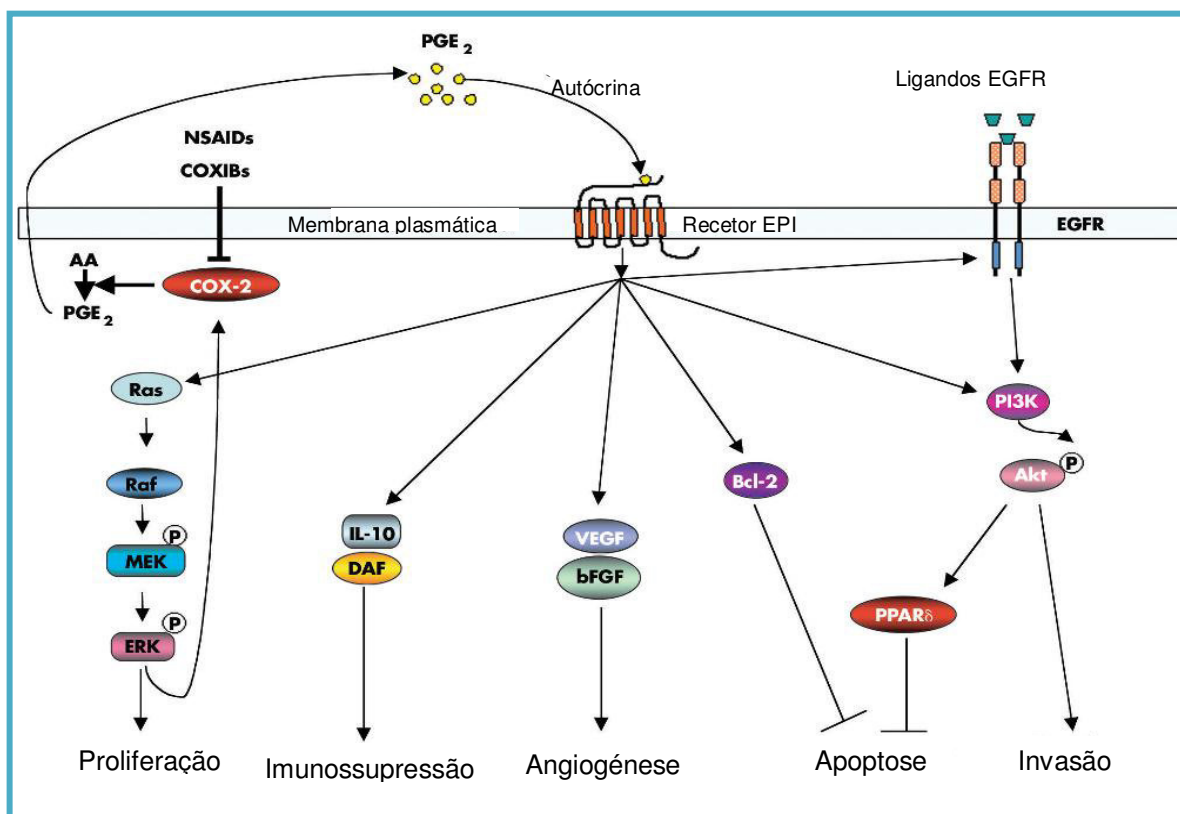


Figura 1 - Papel da prostaglandina E₂ (PGE₂) na carcinogénese (adaptado de Wang & Dubois, 2006).

III.9.2 - COX-2: cancro em humanos

Existem várias evidências que atribuem um contributo das prostaglandinas derivadas da COX-2 na tumorigénese em humanos. O primeiro tumor humano no qual a importância da COX-2 foi investigada foi o cancro colo-rectal. Vários estudos foram realizados após o surgimento das primeiras evidências, tendo a imunohistoquímica demonstrado a expressão da COX-2 em células neoplásicas do epitélio do cólon, assim como, de PGE₂ nos tecidos neoplásicos do cólon (Rigas, Goldman & Levine, 1993; Sano et al., 1995).

Nos últimos anos, o envolvimento da COX-2 noutros tumores humanos tem vindo a ser revelado (cancro de mama, pulmão, próstata, pâncreas, gástrico, etc), apresentando-se a expressão desta enzima muito elevada em alguns deles (Méric et al., 2006; Doré, 2011).

Relativamente ao valor prognóstico da COX-2 nos tumores humanos existe ainda alguma controvérsia, nomeadamente, no caso do cancro colo-rectal onde alguns estudos concluem que a COX-2 não possui impacto no prognóstico, enquanto outros referem que a sua sobreexpressão está relacionada com uma diminuição do tempo de sobrevida (Zafirellis, Agrogiannis & Zachaki, 2008; Peng et al., 2013). No que diz respeito ao cancro de pulmão, de acordo com um estudo recente, a COX-2 não parece ser um fator importante de prognóstico (Turk et al., 2012). Já no cancro de mama, próstata e pâncreas esta enzima tem demonstrado ser um fator muito importante no prognóstico (Juuti, Louhimo, Nordling, Ristimäki & Haglund, 2006; Cohen et al., 2006; Miglietta et al., 2010).

No cancro da mama, a sobreexpressão da COX-2 já foi descrita tanto em carcinomas invasivos como *in-situ*, variando as percentagens de positividade entre os 5% e os 100% consoante os estudos (Howe, Subbaramaiah, Brown & Dannenberg, 2001; Howe & Dannenberg, 2003; Witton, Hawe, Cooke, & Bartlett, 2004). A sobreexpressão desta proteína correlaciona-se com um mau prognóstico, nomeadamente, ser houver negatividade para recetores hormonais, positividade para HER-2, baixa diferenciação, grandes dimensões, maior grau de malignidade, presença de metástases nos linfonodos e à distância, invasão vascular e sobrevivência reduzida (Ristimäki et al., 2002; Denkert et al., 2003; Singh-Ranger, Salhab & Mokbel, 2008).

Para além da expressão pelas células epiteliais mamárias, também a presença de marcação para COX-2 em células do estroma tem vindo a ser relatada, estando correlacionada positivamente com a progressão tumoral (Hu et al., 2009; Rudnick et al., 2011).

Num estudo de Rudnick e colegas, foi possível concluir que os fibroblastos que segregam quantidades elevadas de PGE₂, têm a capacidade de promover o crescimento tumoral através da secreção aumentada de IL-6 (interleucina-6), citocina envolvida no crescimento das células estaminais cancerígenas (Rudnick et al., 2011).

III.9.3 - COX-2 : tumores mamários de cadela

Em 2003, surgiu o primeiro estudo que mostrou ocorrer uma sobreexpressão da COX-2 em tumores mamários caninos. A sobreexpressão foi detetada em 24% dos adenomas e 56% dos adenocarcinomas, tendo sido possível concluir que a expressão da COX-2 é particularmente mais intensa em tumores malignos comparativamente aos benignos (Doré, Lanthier & Sirois, 2003).

Um estudo realizado, em 2005, por Heller e sua equipa, permitiu concluir que a expressão desta enzima correlaciona-se com o tipo histológico do tumor, observando-se uma maior frequência e intensidade de expressão nos tumores menos diferenciados como o carcinoma anaplásico (Heller et al., 2005).

Em 2006, foi realizado um estudo nas espécies canina e felina com o intuito de relacionar a expressão da COX-2 com vários marcadores moleculares de prognóstico (Millanta et al., 2006). Nele foi possível relacionar a expressão elevada da COX-2, na cadela, com a sobreexpressão de HER-2 e com um menor grau de diferenciação. Em ambas as espécies, níveis elevados da COX-2 apresentaram correlação com um pior prognóstico. Ainda neste estudo a positividade obtida para COX-2 foi bastante elevada, sendo de 100% nos tecidos mamários tumorais de cadela. Observou-se, portanto, um valor bastante superior ao descrito por Doré no seu estudo de 2003. Ambos os estudos apresentaram, no entanto, uma característica em comum, o facto de nenhum dos tecidos mamários normais demonstrar positividade para esta enzima (Doré et al., 2003; Millanta, Citi, Della Santa, Porciani & Poli, 2006).

Um outro estudo conduzido por Brunelle, em 2006, permitiu avaliar a expressão da COX-2 e a produção de prostaglandinas em culturas celulares obtidas a partir de glândulas mamárias normais e neoplásicas. Os resultados obtidos foram sobreexpressão da COX-2 nas células neoplásicas e baixa ou ausência de expressão nas células normais. Também no que diz respeito à produção de PGE₂ os resultados foram similares, tendo as células neoplásicas uma expressão significativamente superior ao tecido normal (Brunelle, Sartin, Wolfe, Sirois & Doré, 2006).

Com o objetivo de avaliar a expressão conjunta da COX-1 e COX-2 foram realizados dois estudos que compararam amostras de tecidos de mama normal e neoplásica. Nos dois trabalhos as conclusões foram similares, tendo sido observada expressão da COX-1 em 100% da amostra, num dos estudos, e em 96% no outro. Nestes dois estudos, a expressão da COX-2, contrariamente ao sugerido nos trabalhos anteriores, foi identificada em muitas amostras de mama normal. Nos tecidos neoplásicos verificou-se ocorrer sobreexpressão da COX-2 num número elevado de tumores, atingindo, no ensaio conduzido por Queiroga, 100% dos tumores malignos, com expressão especialmente intensa nos tipos histológicos

classificados como mais agressivos (Mohammed et al., 2004; Queiroga, Alves, Pires & Lopes, 2007).

De modo a melhor averiguar as diferenças na expressão da COX-2 em tecido mamário normal, nos tumores benignos e malignos assim como nas metástases, foi levado a cabo um estudo, em 2009, no qual foi possível concluir que o padrão existente nos tecidos normais é predominantemente apical membranar, contrariamente ao que acontece nos tecidos neoplásicos e adjacentes, onde a expressão surge no citoplasma das células epiteliais (Dias Pereira et al., 2009). Neste estudo é sugerida a teoria de que a localização membranar estará associada a processos fisiológicos da glândula mamária, pois alguns dos fatores reguladores da fisiologia mamária são igualmente indutores da COX-2 (por exemplo: hormonas e o fator de crescimento epidérmico); já a internalização da COX-2 (localização citoplasmática difusa e perinuclear) estará ligada à oncogénese. A presença de expressão citoplasmática/nuclear em tecidos não neoplásicos adjacentes ao tumor, sugere que este padrão poderá ser um sinal precoce de transformação neoplásica (Dias Pereira et al., 2009). Para além do já referido estudo em que se verificou uma correlação significativa entre a sobreexpressão da COX-2 e do HER-2, foram já realizados outros trabalhos com objetivo de avaliar a importância da COX-2 no prognóstico de tumores mamários caninos e a sua associação com outros fatores. Dois estudos foram realizados com o objectivo de analisar a correlação da COX-2 com a angiogénese (Lavalle, Bertagnolli, Tavares & Cassali, 2009; Queiroga, Pires, Lobo & Lopes, 2010b). Para tal, foi avaliada a densidade de microvasos intratumorais (através da marcação do antígeno CD31) e, num dos estudos, foi também quantificada a expressão de VEGF. Os resultados obtidos concluíram existir uma correlação positiva entre os níveis de expressão da COX-2 com o CD31 e o VEGF. Foi ainda possível apurar, através dos dois estudos anteriores e de um outro estudo conduzido por Queiroga et al. (2010), que expressões elevadas da COX-2 estão relacionadas com tempos de recidiva e de sobrevivência menores, e ainda com a presença de metástases nos linfonodos ou à distância (Lavalle et al., 2009; Queiroga et al., 2010b; Queiroga, Pires, Parente, Gregório & Lopes, 2011b).

Foi também desenvolvido um estudo para avaliar as diferenças de expressão da COX-2 em carcinomas inflamatórios comparativamente com outros carcinomas, verificando-se que os valores da COX-2 foram consideravelmente superiores nos carcinomas inflamatórios, o que poderá ser indicativo de que esta proteína tem um papel particularmente importante neste tipo tumoral. Nos carcinomas não inflamatórios com níveis elevados da COX-2, a sua expressão foi relacionada com ulceração cutânea, tumores de maiores dimensões e tempo de recidiva e de sobrevivência menores (Queiroga et al., 2005b).

III.9.4 - Inibidores da COX-2: uso preventivo e terapêutico

Considerando todas as evidências do envolvimento da COX-2 na oncogénese, a inibição desta proteína representa um alvo farmacológico interessante, tanto na prevenção como no tratamento de tumores.

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINES) podem inibir seletivamente ou não a COX-2. Os AINES clássicos, tais como o ácido acetil salicílico e o sulindac, inibem tanto a COX-1 como a COX-2, enquanto os inibidores seletivos (por exemplo: celecoxib e rofecoxib) inibem especificamente a COX-2, minimizando os efeitos gástricos colaterais decorrentes da inibição da COX-1 (Méric et al., 2006; Chen et al., 2008).

Os primeiros ensaios clínicos com o objetivo de avaliar o efeito preventivo de cancro pela utilização de inibidores da COX-2 foram realizados no cancro colo-rectal humano e na polipose adenomatosa familiar (PAF). Numa porção dos pacientes portadores de PAF houve regressão dos pólipos colo-rectais após terapêutica com sulindac (Wadell & Loughry, 1983). Através de um estudo retrospectivo, verificou-se uma redução entre 40 a 50% no risco de desenvolvimento de cancro colo-rectal em pacientes utilizadores de AINES por um período de tempo prolongado (10-15 anos) (Thun, Namboodiri & Heath, 1991; Giovannucci et al., 1994). Para além do cancro colo-rectal, existem outras evidências que revelam um papel preventivo dos AINES em outras neoplasias: gástrica, esofágica, mama, próstata e bexiga (Farrow et al., 1998; Norrish et al., 1998; Castela, Yuan, Gago-Dominguez, Yu & Ross, 2000; Harris, Beebe-Donk & Alshafie, 2006).

Também o uso de AINES no tratamento de pacientes portadores de cancro demonstrou resultados positivos a nível paliativo, como o aumento da sobrevivência e um melhor controlo da dor (Lundholm et al., 1994). Nos últimos anos, vários ensaios pré-clínicos e clínicos foram realizados de forma a avaliar a administração conjunta de AINES com outras terapias como a radioterapia, a quimioterapia e inibidores de outras proteínas como, por exemplo, o trastuzumabe (anticorpo inibidor do HER-2), tendo estas combinações demonstrado resultados animadores no atraso do crescimento tumoral e na diminuição da formação de metástases (Teicher et al., 1994; Mann et al., 2001; Altorki et al., 2002; Valsecchi, Pomerantz, Jaslow & Testes, 2009).

Em medicina veterinária existem também vários estudos que demonstram o benefício da utilização de AINES na prevenção e no tratamento de animais com cancro, efeitos demonstrados em modelos experimentais de neoplasias caninas, nomeadamente, meningiomas, carcinoma das células de transição da bexiga, carcinoma oral das células escamosas e pólipos rectais (Knottenbelt, Mellor, Nixon, Thompson & Argyle, 2006; Lascelles, 2007; Rossmeist Junior, Robertson, Zimmerman, Higgins & Geiger, 2009).

Os inibidores da COX-2 mais estudados em medicina veterinária são o carprofeno, o deracoxib, o firocoxib, o meloxicam e o piroxicam. Embora este último não seja considerado

um inibidor seletivo da COX-2, o seu efeito anti-neoplásico parece estar associado à inibição desta enzima (Lascelles, 2007; Souza, Toledo-Piza, Amorin, Barboza & Tobias, 2009).

Na área das neoplasias mamárias caninas foram realizados, até ao momento, três estudos com o intuito de avaliar a ação destes fármacos.

No primeiro trabalho, efectuado em 2009, pretendeu-se avaliar o efeito da terapêutica com piroxicam comparativamente ao uso de quimioterapia com ciclofosfamida e doxorrubicina, numa amostra de 12 cadelas com carcinoma mamário inflamatório, cuja expressão tumoral da COX-2 foi avaliada. Os resultados demonstraram aumento do tempo médio de sobrevivência nos animais tratados com piroxicam quando comparados com os tratados com quimioterapia tradicional, e ainda melhorias clínicas evidentes, nomeadamente: diminuição do eritema, da dor, do edema e melhoria da qualidade de vida e apetite (Souza et al., 2009).

Mais recentemente, em 2012, foi realizado um estudo para avaliar os efeitos do piroxicam e do deracoxib em linhas celulares de tumores mamários caninos. Os efeitos visíveis destes dois inibidores foram a diminuição da proliferação celular, a indução da apoptose e o aumento do número de células em fase G₀/G₁. Contudo, é de salientar que os efeitos anti-tumorais observados foram apenas visíveis em doses superiores às toleradas *in vivo*, daí que a extrapolação direta para a aplicação clínica não deva ser feita. No entanto, a aplicação intra-lesional ou tópica poderá ser uma opção a explorar já que, desta forma, a concentração dos fármacos no tumor será significativamente aumentada. Foi também observado que a combinação dos dois AINES aumentou significativamente os efeitos citotóxicos, comparativamente ao uso isolado dos inibidores da COX-2 (Alkan et al., 2012).

O terceiro estudo, também realizado em 2012, teve como objectivo avaliar as respostas ao tratamento pós-cirúrgico isolado com carboplatina ou em conjunto com inibidores da COX-2 (piroxicam e previcox), em carcinomas mamários de estadió clínico avançado (T₃N₁₋₂M₀₋₁), após análise da expressão da COX-2. Neste estudo, os resultados demonstraram um aumento do período de sobrevivência nos animais tratados com carboplatina, independentemente da sua associação com inibidores da COX-2. É de salientar, no entanto, que neste ensaio clínico nenhum dos animais foi submetido a administração de inibidores isoladamente, ao contrário do estudo realizado em 2009.

Atualmente os investigadores acreditam e defendem que os inibidores da COX-2 poderão vir a ser um importante adjuvante terapêutico, em particular, nos tumores que apresentam níveis de expressão elevados desta enzima, sendo o uso do firocoxib aparentemente mais seguro, não demonstrando efeitos secundários graves, ao contrário do piroxicam que pode originar problemas gástricos (Lavallo et al., 2012).

IV.1 – Objetivos

- Avaliar a expressão da COX-2 numa amostra de 21 tumores mamários de cadela, através da técnica de imunohistoquímica, utilizando para o efeito dois anticorpos anti-COX-2 (Clone 33, BD Pharmingen Erembodegem, Bélgica; Clone SP21, Biocare Medical, Concord, EUA).
- Correlacionar os resultados da imunohistoquímica relativos à expressão da COX-2 com as seguintes características associadas à neoplasia: aspetos clínico-patológicos (raça, idade, mama afetada, tamanho e número de lesões, presença de ulceração, necrose, calcificação e presença de metástases nos linfonodos); classificação histopatológica e grau de malignidade.
- Avaliar a associação entre expressão da COX-2 com o tempo de sobrevivência pós-cirúrgica.
- Comparar os níveis de expressão e do padrão de distribuição da COX-2 obtidos com cada um dos anticorpos utilizados e suas possíveis implicações em termos de prognóstico e terapêutica.
- Aferir os protocolos de imunohistoquímica que revelem melhores resultados na deteção da COX-2, de modo a contribuir para a uniformização da técnica, uma vez que os resultados têm vindo a revelar-se muito díspares nos diversos laboratórios onde está a ser realizada.

IV.2 - Material e Métodos

IV.2.1 - Recolha de material

Para a realização deste trabalho foram selecionados tumores mamários de cadela, provenientes do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa. Os tumores utilizados foram recebidos no Laboratório durante o ano de 2012, obtidos a partir de cirurgias realizadas no Hospital Escolar da FMV-ULisboa, tendo todas as neoplasias sido fixadas em formol tamponado a 10% por um período não superior a 72h. Procurou-se ainda selecionar tumores de diferentes tipos para que a amostra, no seu conjunto, fosse representativa da tipologia de tumores de mama na cadela.

Uma vez selecionados os tumores mamários que reuniam as condições requeridas, procedeu-se à observação dos respetivos cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina. Nesta fase foi efetuada uma segunda seleção, onde os tumores nos quais se observou extensas áreas de necrose ou evidência de má preservação após a cirurgia foram excluídos, resultando numa amostra final de 21 tumores (62 % malignos e 38 % benignos) provenientes de 12 animais.

Ainda no decorrer da observação histológica, procedeu-se à marcação da zona do tumor com melhores características para avaliação imunohistoquímica da expressão da COX-2, sendo o critério de seleção as zonas mais representativas do tipo de tumor em estudo, com maior concentração de células tumorais.

Através da consulta das fichas clínicas e das requisições de análise de cada animal, foram recolhidas as informações relevantes disponíveis, nomeadamente: a raça, a idade, o tamanho da lesão, mama(s) afetadas(s), número de lesões, presença de ulceração, presença de necrose, presença de calcificação e invasão dos linfonodos regionais.

IV.2.2 - Avaliação histopatológica

O diagnóstico histopatológico foi realizado por uma patologista (Professora Doutora Conceição Peleteiro) de acordo com a classificação histológica de tumores mamários caninos, atualizada recentemente (Goldschmidt et al, 2011).

Para a atribuição do grau histológico de malignidade foram avaliados fundamentalmente três parâmetros: a percentagem do tumor com organização tubular, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico, de acordo com o descrito na tabela 3 já apresentada (Goldschmidt et al., 2011).

IV.2.3 Estudo imunohistoquímico

Para a realização do estudo imunohistoquímico, procedeu-se à marcação da área selecionada nos blocos de parafina dos locais correspondentes aos já marcados nos respetivos cortes corados pela hematoxilina e eosina, tendo sido utilizado para o efeito um biótomo de 6mm (Figura 2). Seguidamente realizaram-se os cortes no micrótomo (Leica RM 2135, Nusslock, Alemanha) com a espessura de 3µm, tendo em cada um dos cortes sido efetuado o destacamento da área circular marcada pelo biótomo para, deste modo, apenas estas áreas serem colhidas nas lâminas, estas últimas revestidas com carga positiva (SuperFrost™ Ultra Plus Adhesion Slides, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham Massachusetts). Após a recolha dos cortes nas lâminas, procedeu-se à colocação das mesmas na estufa a 64 °C durante 1 hora e, seguidamente, numa outra estufa a 37°C *overnight*, permitindo este processo melhorar a aderência dos tecidos às lâminas.



Figura 2 - Técnica de marcação da área tumoral nos blocos de parafina com biótomo de 6mm de diâmetro.

IV.2.3.1 Procedimento adotado

A técnica de imunohistoquímica foi realizada seguindo o protocolo utilizado no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa (Tabela 5), através do método do polímero indireto, utilizando o kit Novocastra™ Novolink™ Max Polymer Detection System (Leica Biosystems). Com o objetivo de averiguar qual a melhor técnica de recuperação antigénica, a melhor diluição de uso para os anticorpos primários, e respetivos tempos de incubação a serem utilizados com os clones selecionados, foram revistos os protocolos publicados na literatura, assim como foram avaliados os resultados obtidos, tendo sido selecionados os protocolos descritos na Tabela 6.

No caso da classificação histológica de um dos tumores pouco diferenciados foi necessário recorrer a imunohistoquímica de marcadores específicos, de modo a identificar o tipo histológico correto. Para o efeito foram utilizados um anticorpo anti-vimentina (Clone V9, M0725, Dako A/S, Glostrup, Dinamarca) e um anticorpo anti-pancitoqueratinas AE1/AE3

(Clone AE1/AE3, M3515, Dako). A vimentina é um marcador de células mesenquimatosas, incluindo as mioepiteliais e o segundo é um marcador de células epiteliais. Para a realização destas imunomarcações foi igualmente utilizado o Kit de deteção referido anteriormente e seguido o protocolo descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Protocolo de imunohistoquímica utilizado no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa.

- 1) **Desparafinar até banho em água destilada:**
 - ✓ Colocar as lâminas em xilol – 10min (± 1 min).
 - ✓ Colocar novamente as lâminas em xilol – 5min (± 1 min).
 - ✓ Desperdiçar o excesso de líquido e colocar lâminas em etanol a 100% - 6min (± 1 min).
 - ✓ Desperdiçar o excesso de líquido e colocar lâminas em etanol a 95% - 6min (± 1 min).
 - ✓ Colocar as lâminas em etanol a 70% - 6min (± 1 min).
 - ✓ Desperdiçar o excesso de líquido e colocar lâminas em água desionizada ou destilada durante 5min.
- 2) **Recuperação antigénica** (variável de acordo com o anticorpo utilizado)
- 3) **Lavagem com PBS – 2 X 5min e marcação com caneta hidrofóbica**
- 4) **Bloqueio de proteínas – 5min ***
- 5) **Lavagem com PBS – 2 X 5min**
- 6) **Incubação com o AC primário** (variável de acordo com o anticorpo utilizado)
- 7) **Lavagem com PBS – 2 X 5min**
- 8) **Inibição da peroxidase endógena – 30min ***
- 9) **Lavagem com PBS – 2 X 5min**
- 10) **Incubação com bloqueio pós-primário – 30min ***
- 11) **Lavagem com PBS – 2 X 5min**
- 12) **Incubação com o polímero – 30min ***
- 13) **Lavagem com PBS – 2 X 5min**
- 14) **Incubação com diaminobenzidina – 8min ***
- 15) **Lavagem com água corrente**
- 16) **Corar com hematoxilina de Mayer ***
- 17) **Lavagem com água corrente**
- 18) **Desidratação** (passos inversos aos descritos no primeiro ponto) e **montagem****

* Novocastra™ Novolink™ Max Polymer Detection System (Leica Biosystems)

** Entelan (Quick-D Mounting Medium, Klinipath, Holanda)

Tabela 6 - Anticorpos primários anti-COX-2 e protocolos adotados

Anticorpo	Diluição/ Tempo de incubação	Recuperação antigénica
Clone 33, BD Pharmingen, Erembodegem, Bélgica	1:100 1 hora	Tampão citrato pH6*, Microondas, 700 W, 15 min
Clone SP21, Biocare Medical, Concord, EUA	1:75 <i>overnight</i>	Tampão citrato pH6*, Panela de pressão, 2.5 min

* Novocastra Leica Epitope Retrieval Solution, x10 concentrate

Como controlo positivo foi usada uma amostra de útero de cadela com piómetra (Brito, 2011). Nos cortes de útero utilizados como controlo negativo, foi feita a substituição do anticorpo primário por PBS (tampão fosfato salino, com pH entre 7,2 e 7,4).

IV.2.3.2 - Avaliação imunohistoquímica de expressão da COX-2

A marcação por imunohistoquímica foi considerada positiva quando se observou coloração castanho escuro correspondendo à formação de polímeros de DAB pela atuação da peroxidase sobre o substrato. Para a avaliação da expressão da COX-2 foram considerados dois parâmetros a saber: a percentagem de células positivas no tecido tumoral (semi-quantitativa) e a intensidade da marcação (tabelas 7 e 8).

A percentagem de células positivas foi estimada após observação microscópica das lâminas. Nos casos em que a observação não foi conclusiva, foi realizada a contagem de um mínimo de 1000 células, recorrendo ao programa Olympus Dp-Soft (Olympus, Tóquio, Japão).

Tabela 7 - Sistema adotado para quantificação de positividade de COX-2 nos tumores mamários.

% de células neoplásicas positivas para COX-2	Escalão
< 10%	0
10-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Tabela 8 - Sistema adotado para classificação da intensidade de marcação para a COX-2.

Intensidade de marcação	Gradação
Discreto	+ (1)
Moderado	++ (2)
Intenso	+++ (3)
Muito intenso	++++ (4)

Tendo em conta as tabelas apresentadas acima, foi atribuída uma pontuação a cada neoplasia, resultante da soma do escalão de percentagem de células positivas para COX-2 com a gradação de intensidade, variando esta pontuação de 1 a 8.

IV.2.3.3 – Análise estatística

A análise estatística da amostra estudada foi efetuada recorrendo aos programas Microsoft Excel® e SPSS® versão 18 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corporation, Chicago, EUA), versão 18. De modo a avaliar as possíveis associações entre a expressão da COX-2 com as restantes variáveis, foi utilizado o teste de Fisher para variáveis qualitativas e o teste de Kruskal Wallis para variáveis quantitativas, sendo os valores obtidos considerados significativos se $p < 0,05$.

V.1 – Variáveis clínico-patológicas

V.1.1 Idade, raça e estatuto reprodutivo

No que diz respeito à distribuição da idade das cadelas na amostra em estudo, constata-se que esta variava entre 4 e 12 anos, situando-se a média nos $9,38 \pm 2,1$ (Gráfico 1).

Relativamente à raça observa-se que 33,3% da amostra corresponde a animais sem raça definida, e os restantes 66,7% se distribuem por diferentes raças bastante dispares no que se refere ao peso como o Chihuahua e o Serra da Estrela (Gráfico 2).

Em relação ao estatuto reprodutivo constata-se que apenas um dos animais tinha sido submetido a ovariectomia no período anterior ao diagnóstico de tumor mamário (Gráfico 3).

Gráfico 1 - Distribuição da amostra de acordo com a idade

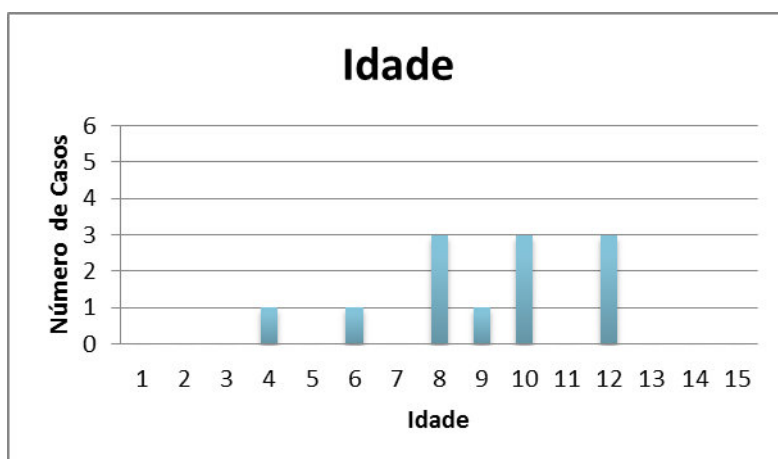


Gráfico 2 - Distribuição da amostra de acordo com a raça

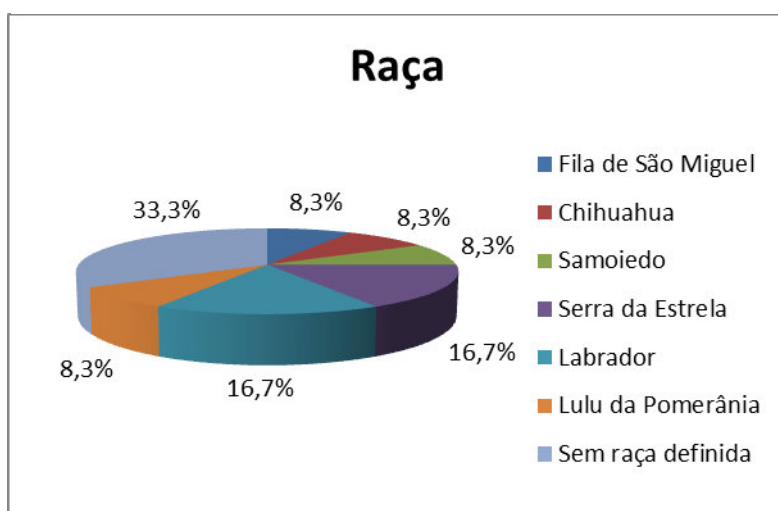


Gráfico 3 - Distribuição da amostra de acordo com o estatuto



V.1.2 – Características associadas ao tumor

De entre os tipos histológicos presentes na amostra, salientam-se os carcinomas tubulares e/ou papilíferos como o grupo com maior peso no total da amostra, representando 42,8 % desta (Tabela 9). Ainda dentro dos tumores malignos, a amostra também apresentava: um carcinoma anaplásico, um carcinoma sólido comedônico, um carcinoma de tipo misto e um mioepitelioma maligno (Figuras 3 e 4). A classificação histológica deste último tumor foi realizada após recurso à imunohistoquímica, pela utilização de anticorpos para marcadores específicos, nomeadamente, a vimentina e as citoqueratinas. Os resultados obtidos revelaram marcação de forte intensidade com o anticorpo anti-vimentina, em praticamente 100% das células tumorais. Já a marcação com os anticorpos anti- citoqueratinas mostrou-se de intensidade moderada estando no entanto presente em apenas 40% das células tumorais (Figura 5). A marcação positiva com os dois anticorpos permite-nos classificar o tumor como um mioepitelioma.

No que diz respeito aos tumores benignos destaca-se a presença dos adenomas tubulares e túbulo-papilíferos, estando ainda presentes dois tumores mistos benignos e um fibroadenoma (Tabela 9).

Relativamente à localização anatómica das mamas afetadas com tumores foi possível verificar que houve uma grande diversidade na localização, existindo lesões em todas as mamas com exceção das torácicas esquerdas (Tabela 9). O número total de mamas afetadas/lesões neoplásicas apresentadas pelas 12 cadelas da amostra foi de 26. Contudo, apenas 21 destas neoplasias foram selecionadas para o estudo, como já referido anteriormente. A maioria dos animais apresentavam 1 ou 2 lesões, dois animais mostravam 3 lesões e outros dois 4 massas simultaneamente (Tabela 9). Em relação ao tamanho dos tumores, 71,4% destes foram incluídos na categoria T1 (< 3cm), sendo portanto esta a

predominante, ainda que 3 dos tumores tenham sido classificados como T3 (>5cm) (Tabela 9). A presença de ulceração, calcificação e necrose foram achados pouco frequentes na amostra, como é possível observar na Tabela 9.

O grau de malignidade predominante foi o grau I (46,2% dos tumores malignos), seguido do grau II (38,5% da amostra), e do grau III em apenas 2 tumores (15,4%) (Tabela 9). A presença de metástases nos linfonodos foi também pouco diagnosticada, afectando apenas 2 animais, sendo que num deles foi possível ter acesso à análise histopatológica dos ovários também estes com presença de metástases (Figura 6).

Tabela 9 - Características tumorais da amostra (frequências absolutas e relativas).

Variável	n	%
Diagnóstico histológico (n= 21)		
Carcinoma tubular	3	14,3
Carcinoma papilífero	3	14,3
Carcinoma túbulo - papilífero	3	14,3
Carcinoma anaplásico	1	4,8
Carcinoma tipo misto	1	4,8
Mioepitelioma maligno	1	4,8
Carcinoma sólido comedónico	1	4,8
Adenoma tubular	3	14,3
Adenoma túbulo- papilífero	2	9,5
Tumor misto benigno	2	9,5
Fibroadenoma	1	4,8
Mama(s) afetada(s) (n=26)		
D1	1	3,9
D2	2	7,7
D3	4	15,4
D4	5	19,2
D5	4	15,4
E1	—	—
E2	—	—
E3	2	7,7
E4	3	11,5
E5	2	7,7
Informação em falta	3	11,5
Número de lesões presentes no mesmo animal (n=12)		
1	4	33,3
2	4	33,3
3	2	16,7
4	2	16,7

Tabela 9 – (continuação)

Tamanho do tumor (n=21)		
T1 (<3cm)	15	71,4
T2 (3-5cm)	3	14,3
T3 (>5cm)	3	14,3
Necrose (n=21)		
Presente	1	4,8
Ausente	20	95,2
Ulceração (n=21)		
Presente	1	4,8
Ausente	20	95,2
Calcificação (n=21)		
Presente	3	14,3
Ausente	18	85,7
Grau de malignidade (n=13)		
Grau I	6	46,2
Grau II	5	38,5
Grau III	2	15,4
Presença de metástases nos linfonodos regionais (n=13)		
Presente	2	15,4
Ausente	11	84,6

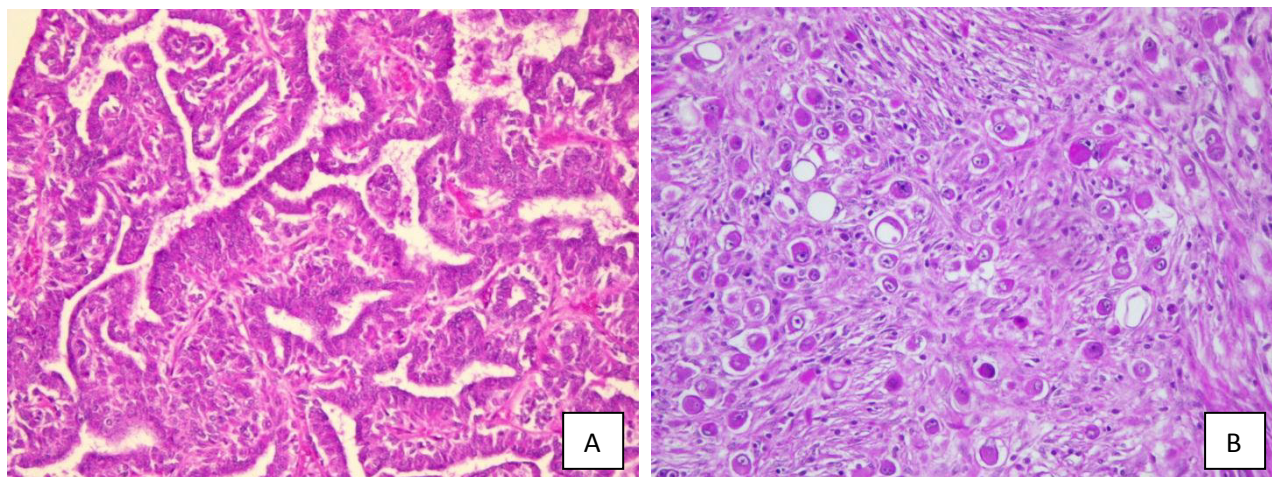


Figura 3 - (A) Carcinoma túbulo-papífero (H&E, x100); (B) Carcinoma anaplásico (H&E,x100).

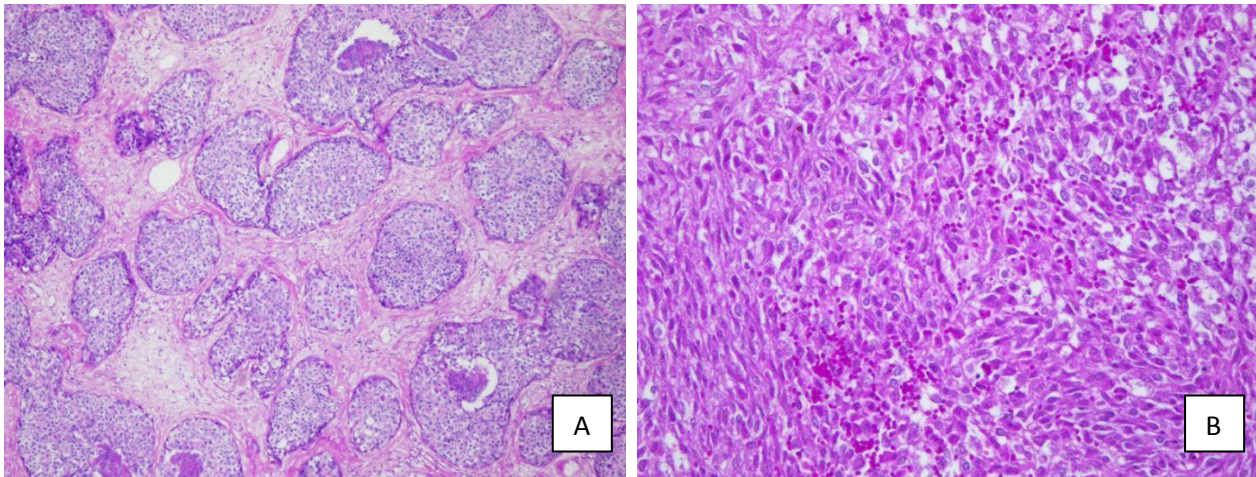


Figura 4 – (A) Carcinoma sólido comedônico (H&E, 40x); (B) Mioepitelioma maligno (H&E, 100x).

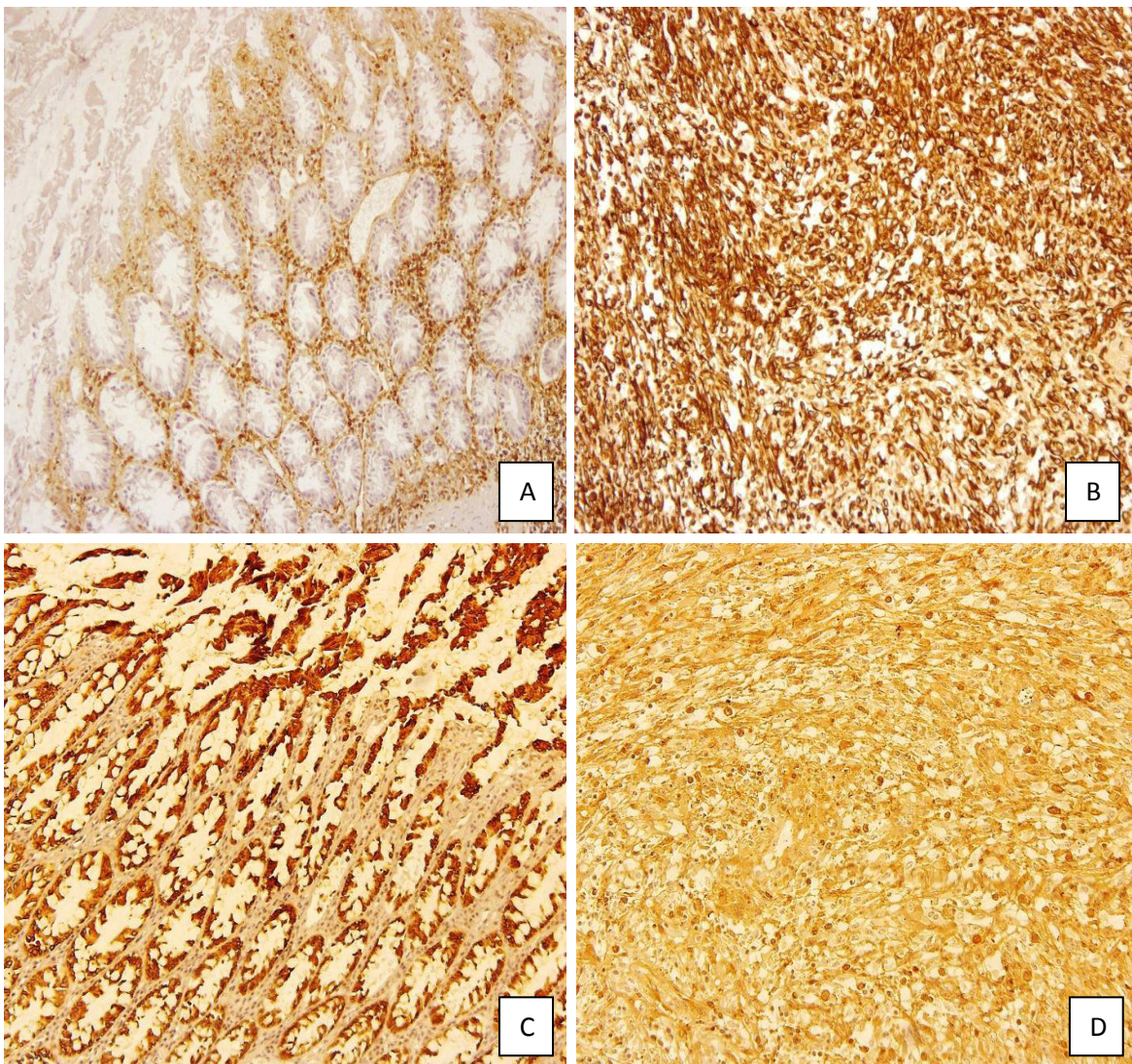


Figura 5 - Marcação imunohistoquímica obtida com os anticorpos anti-vimentina e anti-citoqueratina utilizados para classificação histológica de um mioepitelioma maligno.

(A) Marcação positiva das células mesenquimatosas da lâmina própria do intestino de cão, controle positivo do anticorpo anti-vimentina, coloração com hematoxilina de Mayer (100x); (B) Mioepitelioma maligno, marcação com anticorpo anti-vimentina, demonstrando intensa marcação, em aproximadamente 100% das células tumorais, coloração com hematoxilina de Mayer (100x); (C) Marcação positiva das células epiteliais do intestino de cão, controle positivo do anticorpo anti-citoqueratina AE1/AE3, coloração com hematoxilina de Mayer (100x); (D) Mioepitelioma maligno, marcação com anticorpo anti-citoqueratina AE1/AE3, demonstrando marcação de intensidade moderada em cerca de 40% das células tumorais, coloração com hematoxilina de Mayer (100x).

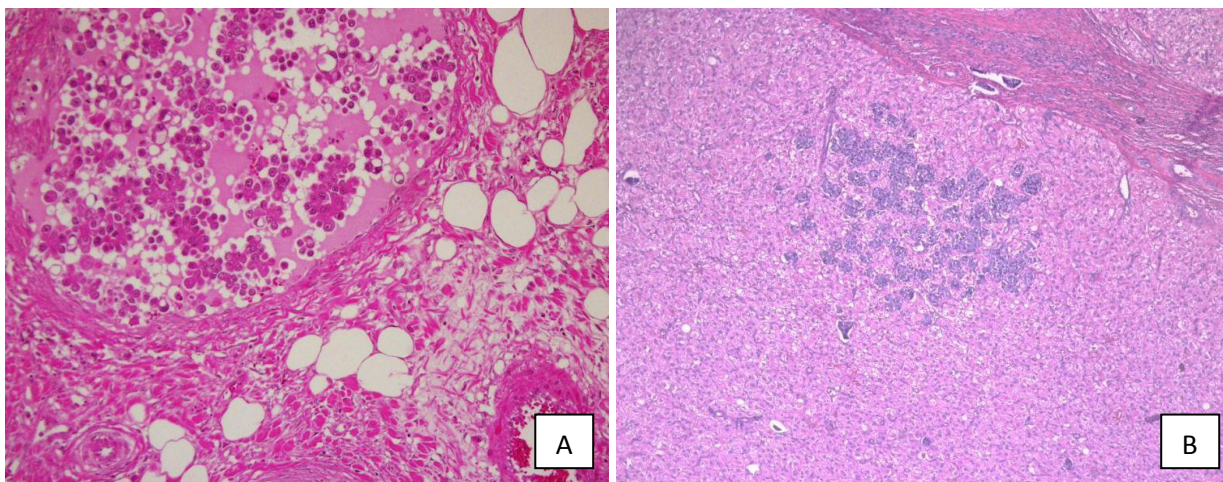


Figura 6 - Metástases em linfonodo e ovário

(A) Linfonodo de cadela portadora de carcinoma anaplásico, evidenciando infiltração de tecido tumoral em cima à esquerda (H&E, 100x); (B) Ovário de cadela portadora de carcinoma sólido comedônico evidenciando infiltração neoplásica no corpo lúteo (H&E, 40x).

V.2 Avaliação da expressão da COX-2 nos tumores mamários caninos da amostra

Na amostra em estudo foi observada expressão da COX-2 a nível citoplasmático num padrão difuso e/ou perinuclear, assim como na membrana citoplasmática das células epiteliais e mioepiteliais. Para além destas células foi também observada positividade em alguns fibroblastos do estroma. A expressão mostrou ter uma forma focal ou difusa, consoante os casos e anticorpo utilizado. O padrão de marcação e a percentagem de positividade mostrou ser díspar nos dois anticorpos utilizados, como descrito em seguida.

V.2.1 – Clone 33

A marcação obtida com o anticorpo clone 33 foi de tipo citoplasmático difuso e perinuclear, apresentando-se, na maioria das neoplasias, com um padrão focal no tecido tumoral (Figura 7), à exceção de alguns tumores em que este padrão foi difuso (Figuras 8 e 9).

Com este anticorpo foi observada expressão da COX-2 nas células do estroma, em 38% das neoplasias (Figura 10). A intensidade de marcação foi geralmente elevada, com alguns tumores a mostrarem uma marcação muito elevada e apenas um tumor com marcação discreta.

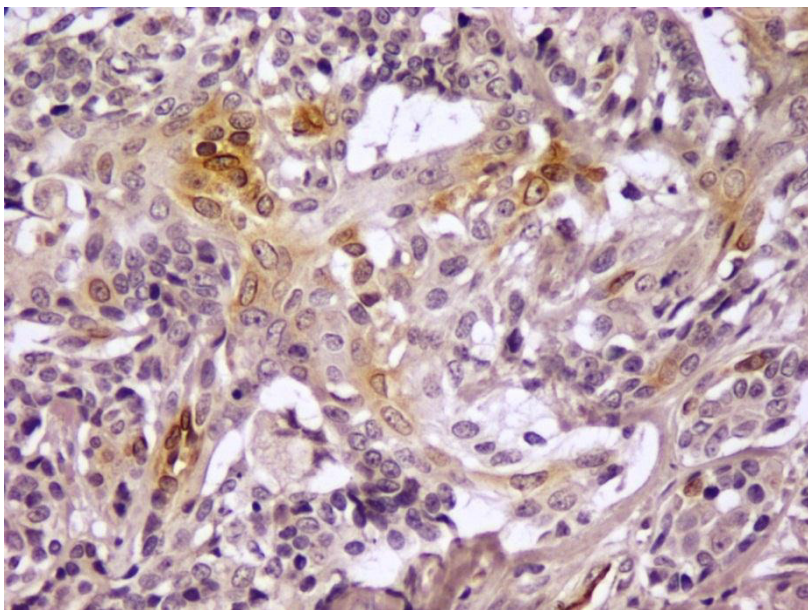


Figura 7 - Carcinoma tubular de grau I. Focos de células tumorais com marcação citoplasmática difusa e perinuclear intensa, pontuação 3 (Clone 33, hematoxilina de Mayer, 200x).

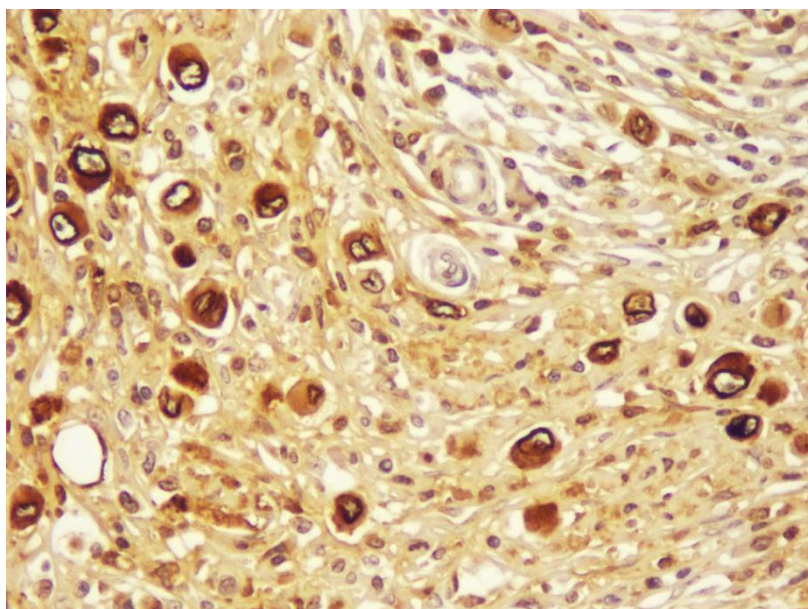


Figura 8 - Carcinoma anaplásico de grau III com marcação citoplasmática difusa e perinuclear muito intensa das células tumorais, pontuação 6 (Clone 33, hematoxilina de Mayer, 200x).

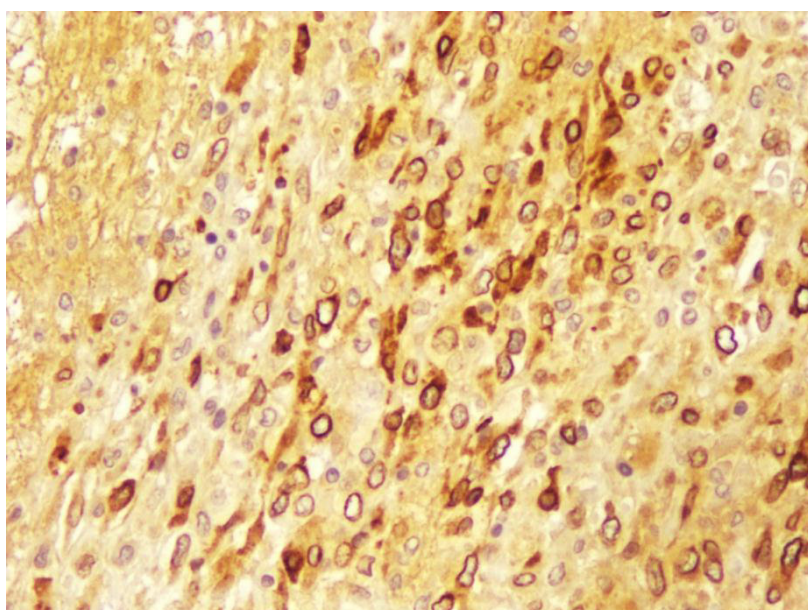


Figura 9 - Mioepitelioma maligno de grau III com marcação perinuclear muito intensa das células tumorais, pontuação 5 (Clone 33, hematoxilina de Mayer, 200x).

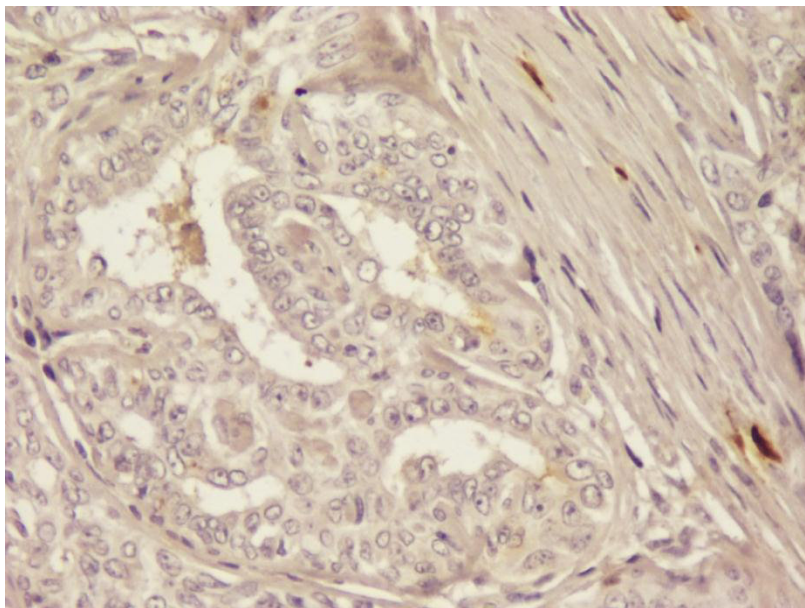


Figura 10 - Carcinoma papilífero de grau II com marcação positiva para COX-2 em algumas células do estroma, pontuação 3 (Clone 33, hematoxilina de Mayer, 200x).

V.2.2 – Clone SP21

Relativamente à imunomarcação obtida com o clone SP21, esta mostrou-se bastante diferente da observada com o clone 33. Identificou-se um padrão comum a praticamente, todas as neoplasias, e em particular nas mais diferenciadas, limitado à membrana citoplasmática das células epiteliais mamárias, apresentando nalguns casos uma distribuição mais irregular, alternando a marcação exclusiva apical com a marcação da totalidade da membrana (Figura 14 B). Em zonas não neoplásicas presentes em alguns tumores, foi possível observar que o padrão é igualmente membranar e, exclusivamente, apical (Figura 11).

Para além deste padrão observou-se uma marcação citoplasmática difusa e perinuclear em algumas amostras tumorais (Figuras 12 e 13).

Comparando as mesmas áreas marcadas pelos dois anticorpos é possível observar uma diferença evidente com ausência de marcação com o clone 33 e marcação membranar com o clone SP21 na mesma área (Figura 14). A intensidade de marcação manteve-se idêntica nos dois anticorpos. Verificou-se igualmente com o clone SP21 marcação positiva em células do estroma, em alguns dos tumores da amostra.

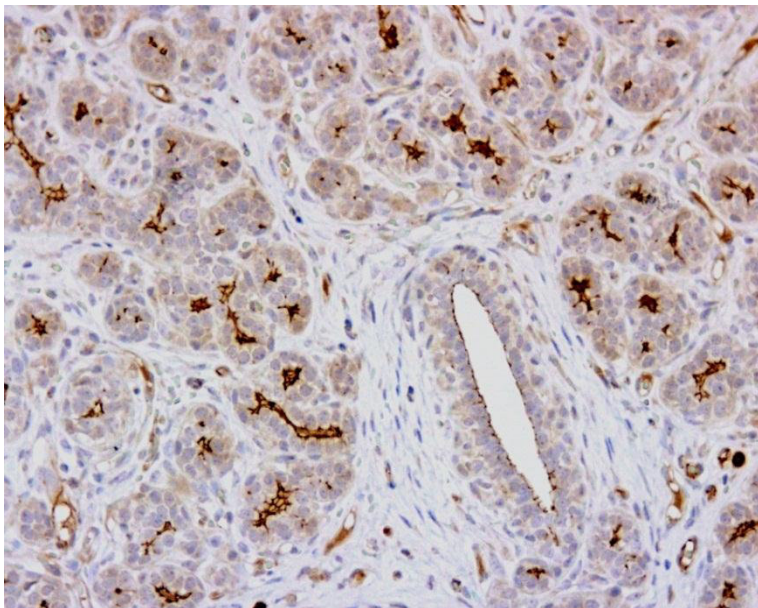


Figura 11 - Glândula mamária não neoplásica com presença de marcação apical membranar intensa, pontuação 7 (Clone SP21, hematoxilina de Mayer, 200x).

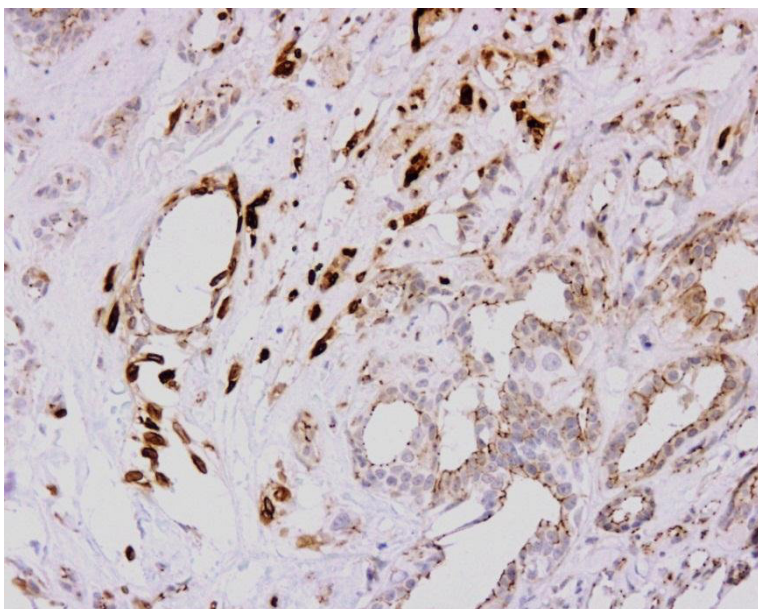


Figura 12 - Carcinoma papilífero de grau III com marcação membranar e citoplasmática, muito intensa, pontuação 8 (Clone SP21, hematoxilina de Mayer, 200x).

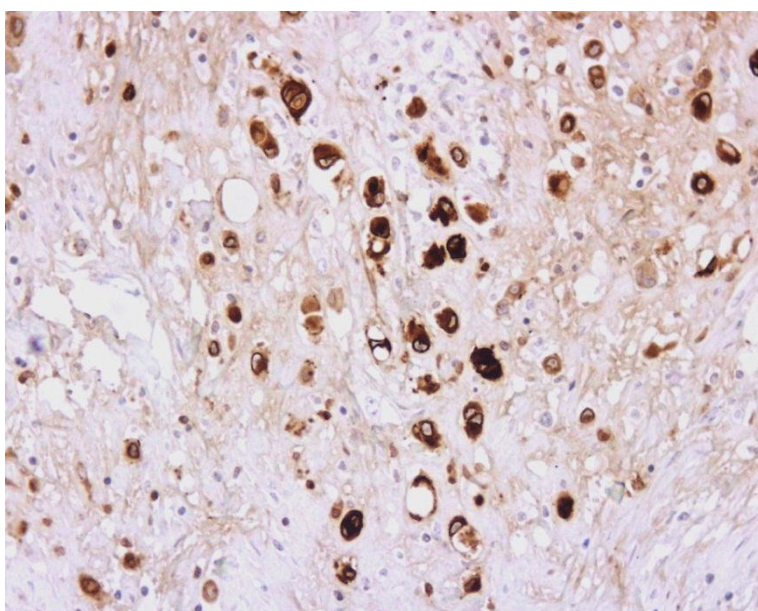


Figura 13 - Carcinoma anaplásico de grau III com marcação citoplasmática difusa e perinuclear muito intensa, pontuação 8 (Clone SP21, hematoxilina de Mayer, 200x).

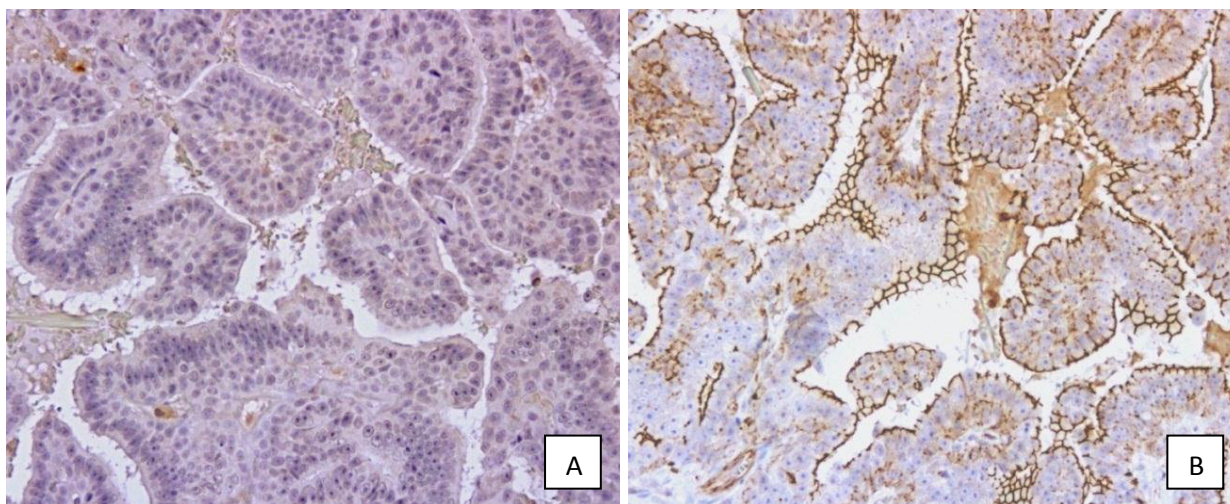


Figura 14 - Diferença de marcação obtida com os dois clones utilizados
(A) Carcinoma papilífero de grau II (Clone 33, hematoxilina de Mayer, 200x); (B) Carcinoma papilífero de grau II (Clone SP21, hematoxilina de Mayer, 200x).

V.2.3 – Pontuação atribuída a cada neoplasia e respectivo padrão predominante – análise comparativa entre os dos anticorpos utilizados

Através da análise da tabela 10 foi possível concluir que a percentagem de marcação imunohistoquímica com o clone 33 foi para a grande maioria dos tumores (85,7%), classificada no escalão 0 (<10% de células positivas). Apenas dois tumores (9,5%) foram classificados como sendo de escalão 1 (10-25% de células positivas) e um tumor (4,8%) com o de escalão 2 (26-50% de células positivas).

Já a percentagem de células com marcação para COX-2 obtida com o clone SP21 foi bastante superior, pertencendo todos os tumores ao escalão 4 (76-100% de células positivas), à exceção de um único classificado como de escalão 1.

No que toca à intensidade de marcação esta manteve-se semelhante nos dois anticorpos utilizados, revelando-se muito intensa (++++) em 14,3% dos tumores, intensa (++++) em 81% dos tumores e discreta (+) em apenas 4,8% da amostra.

Como já foi referido, o padrão de marcação obtido com o clone 33 foi maioritariamente de tipo perinuclear, com as células positivas dispostas em focos distribuídos pelo tecido tumoral. No entanto, dois tumores (um carcinoma anaplásico e um mioepitelioma maligno) mostraram marcação citoplasmática difusa e perinuclear na maioria das células tumorais. Com o clone SP21, a marcação foi membranar mantendo-se, no entanto, a marcação citoplasmática difusa e perinuclear generalizada, observada com o clone 33, sobretudo nos dois tumores atrás mencionados.

Tabela 10 - Pontuação atribuída a cada neoplasia e padrão de marcação predominantemente observado.

<u>Tipo histológico</u>	<u>Clone 33</u>				<u>Clone SP21</u>			
	% de células positivas (Escala)	Intensidade	Pontuação	Padrão predominante	% de células Positivas (Escala)	Intensidade	Pontuação	Padrão predominante
Carcinoma túbulo- papilífero	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Carcinoma tubular	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Carcinoma papilífero	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Carcinoma túbulo-papilífero	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Adenoma túbulo-papilífero	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Tumor misto benigno	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Carcinoma tubular	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Carcinoma tubular	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Carcinoma papilífero	1	4	5	PCF	4	4	8	PCF
Carcinoma anaplásico	2	4	6	PCG	4	4	8	PCG
Carcinoma papilífero	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Carcinoma tipo misto	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Adenoma tubular	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Mioepitelioma maligno	1	4	5	PCG	4	4	8	PCG
Fibroadenoma	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Carcinoma túbulo-papilífero	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Adenoma túbulo-papilífero	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Adenoma tubular	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Tumor misto benigno	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Adenoma tubular	0	3	3	PF	4	3	7	MG
Carcinoma sólido comedônico	0	1	1	PF	1	1	2	MG

Legenda: PF- focos de marcação perinuclear em células tumorais; PCF – focos de marcação citoplasmática difusa e perinuclear em células tumorais; PCG – marcação citoplasmática difusa e perinuclear generalizada; MG – marcação membranar generalizada.

V.3 – Associação estatística da sobreexpressão da COX-2 com variáveis clínico-patológicas

Após a atribuição da respetiva pontuação a cada tumor, tendo em atenção cada clone utilizado, procedeu-se à avaliação das possíveis associações estatísticas com as variáveis clínico-patológicas estudadas, sendo os resultados apresentados na tabela 11.

Tabela 11 - Correlação estatística entre a pontuação obtida para a COX-2 e as variáveis clínico-patológicas avaliadas.

Variável	Pontuação Clone 33				p	Pontuação clone SP21			p
	1	3	5	6		2	7	8	
Idade									
4	0	1	0	0	0,381	0	1	0	0,333
6	0	1	0	0		0	1	0	
8	0	6	0	0		0	6	0	
9	0	0	1	0		0	0	1	
10	0	7	0	0		0	7	0	
12	1	2	1	1		1	2	2	
Raça									
Fila de São Miguel	0	2	0	0	0,280	0	2	0	0,315
Chihuahua	0	2	0	0		0	2	0	
Labrador	1	1	0	0		1	0	1	
Serra da Estrela	0	3	1	0		0	3	1	
Samoiedo	0	0	1	0		0	1	0	
Lulu da pomerânia	0	3	0	0		0	3	0	
Sem raça definida	0	6	0	1		0	6	1	
Tipo histológico									
Carcinoma tubular	0	3	0	0	0,040	0	3	0	0,058
Carcinoma papilífero	0	2	1	0		0	2	1	
Carcinoma túbulo-papilífero	0	3	0	0		0	3	0	
Carcinoma anaplásico	0	0	0	1		0	0	1	
Carcinoma tipo misto	0	1	0	0		0	1	0	
Mioepitelioma maligno	0	0	1	0		0	0	1	
Carcinoma sólido comedônico	1	0	0	0		1	0	0	
Adenoma tubular	0	3	0	0		0	3	0	
Adenoma túbulo- papilífero	0	2	0	0		0	2	0	
Tumor misto benigno	0	2	0	0		0	2	0	
Fibroadenoma	0	1	0	0		0	1	0	
Tamanho tumoral									
T1 < 3cm	0	14	1	0	0,008	0	14	1	0,008
T2 3-5cm	0	3	0	0		0	3	0	
T3 > 5cm	1	0	1	1		1	0	2	
Grau de malignidade									
Grau I	1	6	0	0	0,028	0	6	0	0,028
Grau II	0	3	1	0		1	3	1	
Grau III	0	0	1	1		0	0	2	
Mama afetada									
D1	0	1	0	0		0	1	0	
D2	0	2	0	0		0	2	0	

Tabela 11 – (continuação)

D3	0	1	1	0	0,314	0	1	1	0,184
D4	0	4	0	0		0	4	0	
D5	0	3	0	0		0	3	0	
E3	0	2	0	0		0	2	0	
E4	0	2	1	1		0	2	2	
E5	1	0	0	1		1	0	1	
Número de lesões									
1	1	0	0	0	0,489	1	1	2	0,500
2	1	10	4	2		0	10	0	
3	2	0	0	0		0	4	0	
4	0	0	0	1		0	2	1	
Necrose									
Presente	0	0	1	0	0,190	0	0	1	0,190
Ausente	1	17	1	1		1	17	2	
Calcificação									
Presente	0	2	1	0	0,489	0	2	1	0,489
Ausente	1	15	1	1		1	15	2	
Ulceração									
Presente	0	0	1	0	0,190	0	0	1	0,190
Ausente	1	17	1	1		1	17	2	
Metástases nos linfonodos									
Presente	1	2	0	1	0,152	1	2	1	0,471
Ausente	0	7	2	0		0	7	2	
Esterilização									
Sim	0	1	0	0	1,000	0	1	0	1,000
Não	1	16	2	1		1	16	3	

Ao analisar os resultados presentes na tabela 11 podemos verificar que existe uma associação estatisticamente significativa entre a pontuação da COX-2 e: o tipo histológico (clone 33, $p=0,040$), o tamanho tumoral (clone 33 e clone SP21, $p=0,008$) e o grau de malignidade (clone 33 e clone SP21, $p=0,028$).

Relativamente ao tipo histológico e à sua associação com a pontuação obtida com o clone 33, observa-se que as pontuações mais elevadas foram obtidas em três tumores: um carcinoma papilífero, um carcinoma anaplásico e um mioepitelioma maligno ($p=0,040$). Contudo, uma vez que os dois tipos histológicos com maior pontuação apenas estão representados por um exemplar, poderá questionar-se se esta associação será verdadeiramente significativa.

Quanto ao tamanho do tumor, é possível observar que dois dos três tumores com tamanho superior a 5 cm, apresentaram as pontuações mais elevadas para a imunomarcagem da COX-2 ($p=0,008$). Também em relação ao grau de malignidade se observa que os dois tumores de grau III e um de grau II, apresentam as pontuações mais elevadas ($p=0,028$).

Não se observaram associações significativas com nenhuma das restantes variáveis clínico-patológicas estudadas, para ambos os clones.

V.4 – Pontuação da COX-2 e tempo de sobrevivência

De acordo com os contactos que foram possíveis estabelecer com os proprietários dos animais, confirmou-se a morte de uma das cadelas envolvidas no estudo (portadora de carcinoma sólido comedónico) um mês após a cirurgia. Relativamente aos restantes animais, oito encontram-se vivos e sem complicações decorrentes do(s) tumor(s) mamários retirados cirurgicamente em 2012 (Tabela 12).

Não foi no entanto, possível contactar os proprietários de três animais, dois dos quais apresentaram tumores com pontuações da marcação para COX-2 bastante elevadas, pelo que seria relevante conhecer a sua condição clínica atual. Por esta razão, não foi possível avaliar a associação da pontuação para a COX-2 obtida e o período de sobrevivência.

Tabela 12 - Pontuações obtidas para a COX-2 nas neoplasias em estudo e respetiva condição atual dos animais.

Animal	Número de lesões	Pontuação		Último contacto (dias após cirurgia)	Condição atual
		Clone 33	Clone SP21		
1	2	3	7	527	Viva
		3	7		
2	1	3	7	519	Viva
3	2	3	7	519	Viva
		3	7		
4	1	3	7	514	Viva
5	2	3	7	523	Viva
		3	7		
6	1	5	8	395	Viva
7	3	6	8	—	Desconhecido
		3	7		
		3	7		
8	3	3	7	—	Desconhecido
		3	7		
		3	7		
9	1	5	8	—	Desconhecido
10	1	3	7	457	Viva
11	3	3	7	248	Viva
		3	7		
		3	7		
12	1	1	2	30	Falecida

Na amostra em estudo a média da idade dos animais foi de $9,38 \pm 2,1$ anos, valor de acordo com o descrito na literatura (MacEwen et al., 1989; Pérez-Alenza, 2000; Misdorp, 2002; Lana, Rutteman & Withrow 2007). Relativamente às mamas afetadas, verificou-se que as glândulas mamárias abdominais e inguinais foram as mais atingidas, o que está de acordo com o descrito em trabalhos anteriores (Peleteiro, 1994; Misdorp, 2002). O estatuto reprodutivo demonstrou a sua elevada importância no desenvolvimento dos tumores mamários, sendo que apenas um dos animais tinha realizado uma ovariectomia no período anterior ao diagnóstico de tumor mamário.

Nos diversos estudos onde a deteção da COX-2 foi efetuada em tumores mamários caninos, verifica-se que a percentagem de tumores positivos é bastante variável, havendo autores que referem percentagens de positividade na ordem dos 7,1% a 24% para tumores benignos e de 56% a 76,2% para tumores malignos (Doré et al., 2003; Mohammed et al., 2004; Heller et al., 2005; Queiroga et al., 2011b); outros obtiveram marcações positivas muito próximas dos 100% ou mesmo na totalidade dos casos estudados (Milanta et al., 2006; Millanta et al., 2006; Queiroga et al., 2007; Dias Pereira et al., 2009). No presente trabalho verificou-se que 100% da amostra mostrou expressão para a COX-2, ainda que em diferentes percentagens, intensidades e padrões.

A associação da expressão de COX-2 com o tipo histológico e, em particular com a sobreexpressão em tumores menos diferenciados, foi já evidenciada em alguns trabalhos anteriores (Heller et al., 2005; Millanta et al., 2006; Queiroga et al., 2007). Também no nosso estudo, se verificou a associação entre a expressão desta proteína e determinados tipos histológicos. No entanto, estatisticamente, esta associação não pode ser considerada válida, visto que vários tipos tumorais e, em particular os com maior expressão da COX-2, se encontram representados por apenas um caso. É possível concluir que na amostra analisada, a percentagem de expressão da COX-2 é mais elevada e mais intensa nos tipos histológicos mais indiferenciados, em particular, no carcinoma anaplásico e no mioepitelioma maligno. Verificou-se, no entanto, a exceção do carcinoma sólido comedónico, que apesar de ser bastante indiferenciado e agressivo, a expressão e a intensidade da COX-2 foram bastante baixas. Nos quatro estudos onde este tipo tumoral consta nas amostras analisadas, os resultados obtidos mostraram-se díspares; no estudo de Heller e seus colegas (2005), os dois carcinomas sólidos analisados não apresentaram qualquer marcação para COX-2, enquanto nos estudos de Queiroga e de Dias Pereira todas as amostras de carcinoma sólido apresentaram positividade para esta proteína (Queiroga et al., 2007; Dias Pereira et al., 2009; Queiroga et al., 2010). Estas diferenças podem dever-se

ao comportamento biológico deste tipo histológico, sendo necessário mais estudos com maior número de casos de forma a melhor avaliar estas diferenças (Heller et al., 2005).

O tamanho tumoral revelou uma associação significativa com o nível de expressão da COX-2, de entre os tumores estudados, apenas três possuíam tamanho superior a 5 cm, em particular, um carcinoma anaplásico com 15 cm, um mioepitelioma maligno com 13 cm e um carcinoma sólido comedónico com 10 cm. Como já foi referido anteriormente, os dois primeiros tumores obtiveram as pontuações mais altas para a COX-2, reforçando a associação entre o tamanho tumoral e a expressão desta enzima, indo de encontro aos resultados anteriormente publicados (Queiroga et al., 2005b).

Foi também encontrada uma associação entre a expressão da COX-2 com o grau de malignidade, visto as duas neoplasias classificadas como grau III (correspondentes a um carcinoma anaplásico e um mioepitelioma maligno), apresentarem as pontuações mais altas, tendo esta associação também sido verificada no trabalho de Millanta e seus colegas (Millanta et al., 2006).

É importante referir que apenas os tumores com tamanho superior a 5cm e com grau de malignidade II ou III, obtiveram pontuações superiores a 3 (com o clone 33), ou a 7 (clone SP21), verificando-se uma diferença de expressão notória nos restantes tumores com tamanhos e graus inferiores.

Relativamente às restantes variáveis, não foi verificada nenhuma associação estatisticamente significativa sendo, no entanto, de referir que devido ao tamanho reduzido da amostra, o resultado estatístico pode não revelar a verdadeira tendência da população alvo.

É de salientar que os tumores que apresentavam necrose, calcificação ou ulceração, corresponderam aos mencionados como tendo as pontuações mais elevadas, estando inclusivamente já referida a associação da ulceração tumoral com elevados níveis de expressão da COX-2 (Queiroga et al., 2005b).

A presença de metástases nos linfonodos também já foi anteriormente, associada com a sobreexpressão da COX-2 (Queiroga et al., 2010; Queiroga et al., 2011). Todavia, no presente estudo esta associação não se verificou, o que se poderá dever-se ao reduzido número de casos. De futuro será necessário alargar a amostra de modo a melhor avaliar a associação dos diferentes tipos de tumores com a COX-2 e a presença de metástases tumorais.

A forte associação entre a enzima em estudo, o tempo de recidiva e o período de sobrevivência pós-cirúrgico, foi reportada em vários trabalhos (Queiroga et al., 2005b; Queiroga et al., 2010; Queiroga et al., 2011). Porém, no presente estudo não foi possível identificar esta associação, devido à falta de informação sobre a atual situação clínica de alguns dos animais, em particular, das cadelas portadoras de carcinoma anaplásico e de mioepitelioma maligno. Sabe-se, no entanto, que o prognóstico do carcinoma anaplásico é

mau, com tempos de sobrevivência pós-cirúrgica, em média, de cerca de 2,5 meses (Philibert et al., 2003), e que a perda de diferenciação é igualmente um fator de mau prognóstico (Moore et al., 2006). Considerando estes fatores, será muito possível que estas duas cadelas já não estejam vivas.

O único animal cuja morte foi confirmada, corresponde a uma cadela com carcinoma sólido comedónico que, apesar do baixo nível de expressão para COX-2, é um tumor de um tipo histológico indiferenciado e com mau prognóstico.

Como já foi mencionado, observam-se células do estroma positivas para COX-2 em alguns dos tumores analisados, em particular, nos tumores mistos benignos e em alguns carcinomas tubulares e/ou papilíferos, estando esta observação de acordo com estudos anteriores (Queiroga et al., 2007; Lavallo et al., 2009; Queiroga et al., 2011b). Na mulher existem estudos que associam a expressão da COX-2 nos fibroblastos, com uma progressão tumoral rápida, em particular, do carcinoma *in situ* para o carcinoma invasivo, assim como o favorecimento do crescimento neoplásico através do aumento de secreção da IL-6 (Hu et al., 2008; Rudnick et al., 2011). Apesar de na cadela não existirem estudos similares, é de salientar que já foram encontradas evidências de que a presença de fibroblastos positivos para COX-2 no microambiente das células tumorais, está relacionada com a promoção da angiogénese, adesão e transição epitélio-mesenquimal (Król et al., 2012). Poder-se-á, então, considerar a hipótese de que parte das alterações induzidas pela presença de fibroblastos no tecido tumoral sejam devido à COX-2 expressa nestas células. No entanto, serão necessários mais estudos de forma a confirmar esta hipótese.

Tal como exposto na tabela 10, os padrões de marcação obtidos foram diferentes para os dois anticorpos testados. Relativamente ao clone 33, o tipo de expressão observado a nível citoplasmático difuso e perinuclear, vai ao encontro do descrito em trabalhos anteriormente publicados também em neoplasias mamárias caninas (Queiroga et al., 2007; Queiroga et al., 2010; Queiroga et al., 2011b).

O padrão predominantemente membranar observado com o clone SP21, já tinha sido descrito no trabalho de Dias Pereira (2009), ao contrário do trabalho de Lavallo (2009), onde o padrão de marcação obtido foi idêntico nos dois clones, sem que se tenha observado marcação membranar. É de salientar que os protocolos de imunohistoquímica dos dois trabalhos não são iguais, nomeadamente, no que diz respeito à recuperação antigénica e à diluição do anticorpo, pelo que as diferentes marcações poderão ser explicadas com base nestas diferenças.

O padrão membranar observado com o clone SP21 também nas células não neoplásicas, sugere que a presença desta enzima ao nível da glândula mamária é constitutiva. A importância da COX-2 na manutenção das alterações mamárias decorrentes dos ciclos estrícos é sustentada pelo facto de a expressão desta enzima ser regulada por fatores comuns aos que regulam a normal fisiologia mamária, nomeadamente hormonas

(estrogénio, progesterona, prolactina e hormona do crescimento) e fatores de crescimento como o fator de crescimento epidérmico (Dias Pereira et al., 2009).

As imunomarcações identificadas no presente trabalho vão ao encontro do referido no estudo de Dias Pereira et al., 2009, onde a presença de padrão membranar foi observada em todas as áreas e neoplasias com elevado grau de diferenciação celular, enquanto nos tumores e zonas mais indiferenciadas a expressão da COX-2 foi visível a nível do citoplasma. No trabalho agora apresentado foram incluídos na amostra pequenas áreas de tecidos provenientes de glândula mamária normal, o que permitiu verificar que em algumas zonas não neoplásicas adjacentes aos tumores analisados, o padrão das células normais é de tipo membranar apical, tal como observado no estudo de Dias Pereira (2009). De acordo com Liou et al. (2001), a localização intracelular da COX-2 deverá estar relacionada com a actividade metabólica e função da molécula na célula.

A marcação citoplasmática difusa e perinuclear, deverá então estar associada a alterações proliferativas patológicas, tendo sido observada uma marcação citoplasmática em algumas áreas não neoplásicas, adjacentes a tumores (Dias Pereira et al., 2009), sugerindo que a internalização da enzima COX-2 poderá levar à transformação neoplásica, através da ação parácrina das prostaglandinas produzidas pelas células neoplásicas (Dias Pereira et al., 2009).

Capítulo VII – Conclusões

O envolvimento da COX-2 na carcinogénese mamária canina tem vindo a ser explorado ao longo dos últimos anos, com conclusões similares às descritas para o cancro de mama da mulher. A importância desta enzima como fator de prognóstico e a sua associação a fatores de malignidade já foi demonstrada na cadela, despertando interesse na potencial utilização de fármacos inibidores desta proteína como adjuvantes terapêuticos e/ou preventivos.

Há, no entanto, uma grande variabilidade de resultados na literatura, devido aos diferentes protocolos de processamento das amostras e imunohistoquímicos utilizados, incluindo diversos anticorpos e diferentes concentrações. Acresce ainda como fatores de variabilidade a adoção de diferentes limiares de positividade que dificultam em muito a comparação fiável dos resultados.

Para que a avaliação da COX-2 em tumores mamários caninos possa ser feita de forma padronizada, à semelhança do que acontece com outros marcadores utilizados em oncologia humana (por exemplo o HER-2 e os recetores de estrogénio e progesterona) é necessário proceder à uniformização da técnica de modo a obter resultados possíveis de ser comparados. Para tal, será também importante estabelecer quais os anticorpos anti-COX-2 mais adequados a amostras de cadela.

A presente dissertação permitiu concluir que o padrão de marcação da COX-2 poderá constituir um dado importante em termos de prognóstico e de terapêutica, visto que a marcação membranar está maioritariamente associada a zonas não neoplásicas ou a tumores bem diferenciados, enquanto a marcação no citoplasma está associada a tumores menos diferenciados.

De entre os dois anticorpos utilizados neste trabalho, concluiu-se que o clone SP21 demonstrou ser mais sensível na detecção da COX-2, pela marcação membranar e citoplasmática. No entanto, a nível de valor prognóstico e terapêutico, a marcação citoplasmática difusa e perinuclear será provavelmente a que se deverá ter em maior consideração. Resta acrescentar que ambos os clones utilizados demonstraram resultados coincidentes, se apenas for valorizada a marcação citoplasmática, passando-se a considerar fisiológica a marcação membranar. Este padrão de marcação poderá constituir controlo positivo interno, indicador de boa execução da técnica.

Para além do padrão de imunomarcação, também a percentagem de células positivas para a COX-2 é um fator de grande relevância, sendo crítico o estabelecimento de um limiar de positividade a partir do qual a utilização de inibidores da COX-2 poderá vir a surtir efeitos benéficos. Esta questão não foi ainda explorada, pelo que seria importante a realização de ensaios para implementação de protocolos terapêuticos com estes fármacos, numa amostra

representativa de cadelas portadoras de tumores mamários, e que para a qual se conhecem os níveis de COX-2 para, deste modo, avaliar os efeitos dos AINES em tumores com diferentes níveis e padrões de expressão.

Bibliografia

- Ahn, E.R. & Vogel, C.L. (2012). Dual HER2-targeted approaches in HER2- positive breast cancer. *Breast Cancer Research Treatment*, 131, 371-83.
- Alkan, F., Ustüner, O., Bakirel, T., Cinar, S., Erten, G. & Deniz, G. (2012). The effects of piroxicam and deracoxib on canine mammary tumour cell line. *The Scientific World Journal*, 2012; 2012: 976740.
- Altorki, N.K., Keresztes, R.S., Port, J.L., Libby, D.M., Korst, R.J., Flieder, D.B., Ferrara, C.A., Yankelevitz, D.F., Subbaramaiah, K., Pasmantier, M.W. & Dannenberg, A.J. (2002). Celecoxib (Celebrex), a selective COX-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel/carboplatin in early stage non-small cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21 (14), 2645-50.
- Benjamin, S.A., Lee, A.C., Saunders, W.J. (1999). Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Veterinary Pathology*, 36, 423–436.
- Bergman, P. J. (2007). Mammary gland tumors. International Veterinary Information Service (IVIS) Acedido em Mar 15, 2013, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/lavc/2007/bergman2.pdf>.
- Bird, R.C., Deinnocentes, P., Bird, A.C.E., van Ginkel, F.W., Lindquist, J. & Smith, B.F. (2011). An autologous dendritic cell canine mammary tumor hybrid-cell fusion Vaccine. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 60(1), 87-97.
- Block, G.E., Jensen, E.V. & Polley, T.Z. (1975). The prediction of hormonal dependency of mammary cancer. *Annals of Surgery*, 182, 342- 352.
- Bloom, H.J. & Richardson W.W. (1957) Histological grading and prognosis in breast cancer. *British Journal Cancer*, 11, 359-377.
- Bostock, D.E., Moriarty, J. & Crocker, J. (1992). Correlation between histologic diagnosis mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumors, *Veterinary Pathology*, 29, 381-385.
- Brito, S.A.P. (2011). Produção de prostaglandinas pelo endométrio canino ao longo do ciclo éstrico e a sua relação com a transcrição de genes dos toll-like receptors. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- Brunelle, M., Sartin, E.A., Wolfe, L.G., Sirois, J. & Doré, M. (2006). Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines. *Veterinary Pathology*, 43 (5), 656-66.
- Burkitt, H.G., Young, B. & Heath, J.W. (1994). Sistema Reprodutor Feminino. In Burkitt, H. George, *Wheater histologia funcional*. (3ª ed). (pp. 362-365). Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Castelao, J.E., Yuan, J.M., Gago-Dominguez, M., Yu, M.C. & Ross, R.K. (2000). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention. *British Journal of Cancer*, 82, 1364-1369.
- Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S. & Simmons, D.L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by

acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 13926–13931.

- Chang, C.C., Tsai, M.H., Liao, J.W., Chan, J.P., Wong, M.L., Chang, S. (2009). Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal American Veterinary Medical Association*, 235(4), 391-396.
- Chang, S.C., Chang, C.C., Chang, T.J. & Wong, M.L. (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998–2002). *Journal American Veterinary Medical Association*, 227, 1625–1629.
- Chang, S.H., Liu, C.H., Conway, R., Han, D.K., Nithipatikom, K., Trifan, O.C., Lane, T.F. & Hla, T. (2004). Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 591–6.
- Chen, Y.F., Jobanputra, P., Barton, P., Bryan, S., Fry-Smith, A., Harris, G. & Taylor, R.S. (2008). Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*, 1, 1–278.
- Chrisp, C.E. & Spangler, W.L. (1980). The malignant canine mammary tumor as a model for the study of human breast cancer. In: *The Canine as a Biomedical Research Model: Immunological, Hematological, and Oncological Aspects*, (pp. 331–349). National Technical Information Center/US Department of Energy, Springfield, VA.
- Chu, L.L., Rutteman, G.R., Kong, M.C., Ghahremani, M., Schmeing, M., Misdorp, W., van Garderen, E. & Pelletier, J. (1998). Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. *Breast Cancer Research Treatment*, 50, 11-25.
- Clemente, M., Perez-Alenza, M.D., Illera, J.C. & Peña L. (2010). Histologic, immunologic and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Veterinary Pathology*, 47, 265–274.
- Clevenger, C.V., Furth, P.A., Hankinson, S.E. & Shuler, L.A. (2003). The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocrine Reviews*, 1, 1–27.
- Cohen, B.L., Gomez, P., Omori, Y., Duncan, R.C., Civantos, F., Soloway, M.S., Lokeshwar, V.B. & Lokeshwar, B.L. (2006). Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is an independent predictor of prostate cancer recurrence. *International Journal of cancer*, 119(5), 1082-1087.
- Cunningham, G.J. (2004). *Tratado de Fisiologia Veterinária*. Rio de Janeiro, 3ª ed, Editora Guanabara Koogan S.A.
- Dannenbergh, A.J., Lippman, S.M., Mann, J.R., Subbaramaiah, K. & Dubois, R.N. (2005). Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *Journal of Clinical Oncology*, 23(2), 254–266.
- Davies, A.A., Masson, J.Y., McIlwraith, M.J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A.R. & West, S.C. (2001). Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Molecular Cell*, 7, 273-282.

- Della Bella, S., Molteni, M., Compasso, S., Zulian, C., Vanoli, M. & Scorza, R. (1997). Differential effects of cyclo-oxygenase pathway metabolites on cytokine production by T lymphocytes. *Prostaglandins, Leukotriene, and Essential Fatty Acids*, 56, 177–84.
- Denkert, C., Winzer, K.J., Müller, B.M., Weichert, W., Pest, S., Köbel, M., Kristiansen, G., Reles, A., Siegert, A., Guski, H. & Hauptmann, S. (2003). Elevated Expression of Cyclooxygenase-2 Is a Negative Prognostic Factor for Disease Free Survival and Overall Survival in Patients with Breast Carcinoma. *Cancer*, 97(12), 2978-87.
- Depowski, P.L., Rosenthal, S.I. & Ross J.S. (2001). Loss of expression of the *PTEN* gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Modern Pathology* 14, 672-676.
- Dias Pereira, P., Lopes, C.C., Matos, A.J., Santos, M., Gärtner, F., Medeiros, R & Lopes, C. (2009). Cox-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. *Journal of Comparative Pathology*, 140(4), 247-253.
- Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K. & Wood, J.L. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 43, 240-246.
- Dobson, M.J. & Iscels B.D.X. (2011). *BSAVA Manual of canine and feline oncology*, 3rd ed, British Small Animal Veterinary Association (Gloucester). pp. 244-253.
- Doré M. (2011). Cyclooxygenase-2 Expression in Animal Cancers. *Veterinary Pathology*, 48(1), 254-265.
- Doré, M., Lanthier, I. & Sirois, J. (2003). Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 40, 207–212.
- DuBois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., Lipsky, P.E., Abramson, S.B. & Crofford, L. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB Journal*, 12 (12), 1063-1073.
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A. & von Euler, H. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, 69 (1-2), 109-27.
- Elston, C.W. & Ellis I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19, 403-10.
- Farrow, D.C., Vaughan, T.L., Hansten, P.D., Stanford, J.L., Risch, H.A., Gammon, M.D., Chow, W.H., Dubrow, R., Ahsan, H., Mayne, S.T., Schoenberg, J.B., West, A.B., Rotterdam, H., Fraumeni, J.F. & Jr, Blot, W.J. (1998). Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 7 (2), 97-102.
- Ferretti, G., Felici, A., Papaldo, P., Fabi, A. & Cognetti, F. (2007). HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. *Current Opinion in Obstetrics Gynecology*, 19, 56–62.
- Ford, D., Easton, D.F. & Stratton, M. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *American Journal of Human Genetics*, 62, 676–89.

- Fossum, T.W. (2007). Surgery of the reproductive and genital systems. In T.W. Fossum, C.S. Hedlund, A.L. Johnson, K.S. Schulz, H.B. Seim III, M.D. Willard, A. Bahr, G.L. Carrol (Eds.), *Small animal surgery* (3rd ed.). (pp.729-739). Missouri, UK: Mosby Elsevier.
- Fukuda, M. (1996). Possible roles of tumour-associated carbohydrate antigens. *Cancer Research*, 56, 2237-2244.
- Funakoshi, Y., Nakayama, H., Uetsuka, K., Nishimura, R., Sasaki, N. & Doi, K. (2000). Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Veterinary Pathology*, 37, 177-183.
- Gama, A., Alves, A. & Schmitt F. (2008). Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch*, 453, 123-132.
- Gama, A., Alves, A., Gartner, F. & Schmitt. F. (2003). p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Veterinary Pathology*, 40, 412-420.
- Gama, A., Gartner, F., Alve, A. & Schmitt. F. (2009). Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (Egfr) in canine mammary tissues. *Research Veterinary Science*, 87, 432-437.
- Gentschev, I., Stritzker, J., Hofmann, E., Weibel, S., Yu, Y.A., Zhang, Q., Bullerdiek, J., Nolte, I. & Szalay, A.A. (2009). Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. *Cancer Gene Therapy*, 16(4), 320-328.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U. & Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki- 67. *Journal of Immunology*, 133, 1710-1715.
- Gilbertson, S. R., Kurzman, I. D., Zachrau, R. E., Hurvitz, A. I. & Black, M. M. (1983). Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*, 20, 127-142.
- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Ascherio, A. & Willett, W.C. (1994). Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Annals of Internal Medicine*, 121, 241-6.
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, L., & Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48, 117.
- Hampe, J.F. & Misdorp, W. (1974). IX: tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bulletin of World Health Organization*, 50, 111-133.
- Hankinson, S.E., Willett, W.C., Michaud, D.S., Manson, J.E., Colditz, G.A., Longcope, C., Rosner, B. Speizer, F.E. (1999). Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *Journal National Cancer Institute*, 91(7), 629-634.
- Hansen-Petrik, M.B., McEntee, M.F., Jull, B., Shi, H., Zemel, M.B. & Whelan, J. (2002). Prostaglandin E2 Protects Intestinal Tumors from Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-induced Regression in Apc (Min/+) Mice. *Cancer research*, 62(2), 403-408.

- Harris, R.E., Beebe-Donk, J. & Alshafie, G.A. (2006). Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *BMC Cancer*, 30, 6-27.
- Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. & Phipps, R.P. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*, 23, 144–50.
- Heller, D.A., Clifford, C.A., Goldschmidt, M.H., Holt, D.E., Shofer, F.S., Smith, A. & Sorenmo, K.U. (2005). Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Veterinary Pathology*, 42, 776–780.
- Hellmén, E., Bergstrom, R., Holmberg, L., Spångberg, I.B., Hansson, K. & Lindgren, A. (1993). Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology*, 30, 20-27.
- Hirayama, K., Yokota, H., Onai, R., Kobayashi, T., Kumata, T., Kihara, K., Okamoto, M., Sako, T., Nakade, T., Izumisawa, Y. & Taniyama, H. (2002). Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. *Journal of Comparative Pathology* 127, 249-256.
- Howe, L.R. & Dannenberg, A.J. (2003). COX-2 inhibitors for the prevention of breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*, 8, 31-43.
- Howe, L.R., Subbaramaiah, K., Brown, A.M. & Dannenberg, A.J. (2001). Cyclooxygenase-2: a target for prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine Related Cancer*, 8, 97-114.
- Hsu, H., Lin, H., Chiou, S., Chang, C., Wang, S., Lin, K., Chulakasian, S., Wong, M. & Chang, S. (2010). Mouse mammary tumor virus-Like nucleotide sequences in canine and feline mammary tumors. *Journal of clinical microbiology*, 48(12), 4354-4362.
- Hsu, W.L., Huang, H.M., Liao, J.W., Wong, M.L. & Chang S.C. (2009). Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Veterinary Journal*, 180, 116–123.
- Hu, M., Peluffo, G., Chen, H., Gelman, R., Schnitt, S. & Polyak, K. (2009). Role of COX-2 in epithelial-stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3372-3377.
- Itoh, T., Uchida, K., Ishikawa, K., Kushima, K., Kushima, E., Tamada, H., Moritake, T., Nakao, H. & Shii, H. (2005). Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67, 345-347.
- Juuti, A., Louhimo, J., Nordling, S., Ristimäki, A. & Haglund, C. (2006). Cyclooxygenase-2 expression correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 59 (4), 382-386.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C. & Dessiris, A. (2005). Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology*, 133, 246–252.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C. & Dessiris, A. (2001). Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *Journal of Veterinary Medicine*, 48, 85-96.

- Kawamori, T., Uchiya, N., Nakatsugi, S., Watanabe, K., Ohuchida, S., Yamamoto, H., Maruyama, T., Kondo, K., Sugimura, T. & Wakabayashi, K. (2001). Chemopreventive effects of ONO-8711, a selective prostaglandin E receptor EP(1) antagonist, on breast cancer development. *Carcinogenesis*, 22 (12), 2001–2004.
- Kerns, B.J., Pence, J.C., Huper, G., Kinney, R.B. & Iglehart, J.D. (1990). *cerbB- 2* expression in breast cancer detected by immunoblotting and immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 38, 1823-1830.
- Kim, K., Chie, E.K., Han, W., Noh, D.Y., Park, I.A., Oh, D.Y., Im, S.A., Kim, T.Y., Bang, Y.J. & Ha, S.W. (2010). Prognostic value of p53 and bcl- 2 expression in patients treated with breast conservative therapy. *Journal Korean Medicine Sciences*, 25, 235-239.
- Kleinberg, D.L., Wood, T.L., Furth, P.A. & Lee, A.V. (2009). Growth hormone and insulin-like growth factor-I in the transition from normal mammary development to preneoplastic mammary lesions. *Endocrine Reviews*, 30, 51-74.
- Knottenbelt, C. D., Mellor, C., Nixon, H., Thompson, & Argyle, D.J. (2006). Cohort study of COX-1 and COX-2 expression in canine rectal and bladder tumors. *Journal of Small Animal Practice*, 47, 196-200.
- Król, M., Pawłowski, K.M., Szyszko, K., Maciejewski, H., Dolka, I., Manuali, E., Jank, M. & Motyl, T. (2012). The gene expression profiles of canine mammary cancer cells grown with carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) as a co-culture in vitro. *BMC Veterinary Research*, 27, 8-35.
- Kumaraguruparan, R., Karunagaran, D., Balachandran, C., Manohar, B.M. & Nagini, S. (2006). Of humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *International journal of clinical chemistry*, 365, 168-76.
- Kurzman, I.D. & Gilbertson, S.R. (1986). Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, 1, 25–32.
- Lagadic, M. & Estrada, M. (1990). Canine mammary tumours: criteria for histologic prognosis and relevance of a grading system. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, numéro especial de cancerologia.
- Lamote, I., Meyer, E., Massart-Leen, A.M. & Burvenich, C. (2004). Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids*, 69, 145- 159.
- Lana, S.E., Rutteman, G.R. & Withrow, S.J. (2007). Tumors of the mammary gland. In: Withrow SJ and Vail DM. Withrow & MacEwen's, *Small Animal Clinical Oncology* (4th ed.). (pp 619-636). St. Louis, Saunders Elsevier.
- Lascelles, B.D.X. (2007). Supportive Care for the Cancer Patient. In: Small Animal Clinical Oncology (Withrow SJ and EG MacEwen, eds). 4th Ed, pp. 291-206, WB Saunders, St. Louis, USA.
- Lavalle, G.E., Bertagnolli, A.C., Tavares, L.F. & Cassali, G.D. (2009). Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology*, 46, 1275–1280.
- Lavalle, G.E., De Campos, C.B., Bertagnolli, A.C. & Cassali, G.D. (2012). canine malignant mammary gland neoplasm with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. *In vivo*, 26 (3), 375-9.

- Lee, C.H., Kim, W.H., Lim, J.H., Kang, M.S., Kim, D.Y. & Kweon, O.K. (2004). Mutation and overexpression of *p53* as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*, 5, 63-69.
- Liou, J., Deng, W., Gilroy, D., Shyue, S. & Wu, K. (2001). Colocalization and interaction of cyclooxygenase-2 with caveolin-1 in human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 34975-34982.
- Llovera, M., Touraine, P., Kelly, P. Goffin, V. (2000). Involvement of prolactin in breast cancer: redefining the molecular targets. *Experimental Gerontology*, 35(1), 41–51.
- Loukopoulos, P., Mungall, BA., Straw, R.C., Thornton, J.R. & Robinson, W.F. (2003). Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. *Veterinary Pathology*, 40, 382-394.
- Lundholm, K., Gelin, J., Hylander, A., et al. Lönnroth, C., Sandström, R., Svaninger, G., Körner, U., Gülich, M., Kärrefors, I., Norli, B. (1994). Anti-inflammatory treatment may prolong survival in undernourished patients with metastatic solid tumors. *Cancer Research*, 54, 5602–6.
- MacEwen, E.G. & Withrow, S.J. (1989). In: Clinical Veterinary Oncology. Editores – S.J.Withrow & MacEwen. J.B. Lippincott Company.
- MacEwen, E.G., Patnaik, A.K., Harvey, H.J. & Panko, W.B. (1982). Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer Research*, 42, 2255-2259.
- Mann, M., Sheng, H., Shao, J., Williams, C.S., Pisacane, P.I., Sliwkowski, M.X. & DuBois, R.N. (2001). Targeting cyclooxygenase 2 and HER-2/neu pathways inhibits colorectal carcinoma growth. *Gastroenterology*, 120, 1713–9.
- Martin de las Mulas J, Ordas J, Millan, M.Y., Chacon, F., De Lara M Espinosa de los Monteros, A., Reymundo, C. & Jover, A. (2004). Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in normal and tumoral canine mammary glands. *Veterinary Pathology*, 41, 269-272.
- Martin De las Mulas, J., Millán, Y. & Dios, R. (2005). A Prospective Analysis of Immunohistochemically Determined Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Expression and Host and Tumor Factors as Predictors of Disease-free Period in Mammary Tumors of the Dog. *Veterinary Pathology*, 42, 200-212.
- Matos, A.J. F. (2007). Prognostic factors in canine mammary tumours, dissertação de doutoramento em ciências veterinárias, instituto de ciências Biomédicas Abel Salazar, universidade do Porto.
- Matos, A.J., Faustino, A.M., Lopes, C., Rutteman, G.R. & Gärtner, F. (2006). Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Veterinary Record*, 158 (18), 626-30.
- Matos, I., Dufloth, R., Alvarenga, M., Zeferino, L.C. & Schmitt, F. (2005). p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch*, 447, 688-694.
- Méric, J.B., Rottey, S., Olaussen, K., Soria, J.C., Khayat, D., Rixe, O. & Spano, J.P. (2006). Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*, 59 (1), 51-64.

- Merlo, D.F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., Ratto, A., Sambucco, P.L., Sestito, V., Tanara, G. & Bocchini, V. (2006). Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*; 22(4), 976-84.
- Miglietta, A., Toselli, M., Ravarino, N., Vencia, W., Chiecchio, A., Bozzo, F., Motta, M., Torchio, B. & Bocca, C. (2010). COX-2 expression in human breast carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14 (7), 655-664.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I. & Poli, A. (2005). Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research Veterinary Science*, 79(3), 225-32.
- Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M. & Poli, A. (2006). COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research Treatment*, 98, 115–120.
- Misdorp, W. (2002). Tumors of the mammary gland. In D.J. Meuten (Ed.), *Tumors in domestic animals* (4rd ed.). (pp. 575-606). Iowa: Iowa State Press.
- Misdorp, W., Else, R.W., Hellmen, E. & Lipscomb, T.P. (1999). *Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*, 2nd ser., vol. 7. Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization, Washington, DC.
- Misdorp, W., Cotchin, E., Hampe, J.F. (1971). Canine malignant mammary tumors. I. Sarcomas, *Veterinary Pathology*, 8, 99-177.
- Mohammed, S.I., Khan, K.N., Sellers, R.S., Hayek, M.G., DeNicola, D.B., Wu, L., Bonney, P.L. & Knapp, D.W. (2004). Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 70, 479–483.
- Mol, J.A., Selman, P.J., Sprang, E.P., Van Neck, J.W., Oosterlaken-Dijksterhuis, M.A. (1997). The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *Journal of Reproduction Fertility*, 51, 339-344.
- Monteiro-Riviere, N., Stinson, A., Lois Calhoun, H. (1994). Integumento. In Dieter Dellmann, H., *Histología Veterinária*. (2^a ed). (pp. 232-368). Zaragoza, Espanha: Ed. Acribia.
- Moore, A. (2006). Advances in the treatment of mammary neoplasia. In M. Svoboda (Ed.), *Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association, Prague, Czech Republic*. Czech Republic: World Small Animal Veterinary Association.
- Morris, J.S., Dobson, J.M., Bostock, D.E. (1993). Use of tamoxifen in the control of mammary neoplasia. *Veterinary Record*, 133, 539-542.
- Munro, J.M., Lo, S.K., Corless, C., Nasir, L., Morgan, I.M. & Philbey, A.W. (1992) Expression of sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes, and lymphoid tissues. *The American Journal of Pathology*, 141, 1397–1408.
- Nakagawa, T., Uyama, R., Ohashi, E., Takahashi, T., Hong, S.H., Mochizuki, M., Matsunaga, S., Nishimura, R. & Sasaki, N. (2002). The expression of sialyl Lewis X in canine and feline mammary gland tumors. *Journal Veterinary Medical Science*, 64, 949–952.

- Needleman, P. & Isakson, P.C. (1997). The discovery and function of COX-2. *Journal Rheumatology Supplement*, 49, 6–8.
- Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Sánchez, M.A., Flores, J.M. & Castaño, M. (2000). Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Veterinary Pathology*, 37(3), 239-47.
- Norrish, A.E., Jackson, R.T. & McRae, C.U. (1998). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer progression. *International Journal of Cancer*, 77 (4), 511- 15.
- Owen, L.N. (1980). WHO, TNM classification of tumours in Domestic Animals. In: *Clinical Veterinary Oncology*. Editores - S.J.Withrow e E.G. MackEwen. J.B. Lippincott Company.
- Peleteiro, M.C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 89 (509), 4-29.
- Peleteiro, M.C., Marcos, R., Santos, M., Correia, J., Pissarra, H. & Carvalho, T. (2011). *Atlas de Citologia Veterinária*. Lisboa. LIDEL - Edições técnicas.
- Peña, L.L., Nieto, A.I., Perez-Alenza, D., Cuesta, P. & Castano, M. (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and PcnA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10, 237-246.
- Peng, L., Zhou, Y., Wang, Y., Mou, H. & Zhao, Q. (2013). Prognostic Significance of COX-2 Immunohistochemical Expression in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *PloS One*, 8 (3).
- Pérez-Alenza MD, Peña L, Del Castillo N , Nieto AI. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. (2000). *Journal of Small Animal Practice*, 41:287-291.
- Pérez-Alenza, M.D., Rutteman, G.R., Peña, L., Beynen, A.C. & Cuesta P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. (1998). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12(3):132-9.
- Philibert, J.C., Snyder, P.W., Glickman, N., Glickman, L., Knapp, D., Waters, D. (2003). Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, 102–106.
- Pinho, S.S., Matos, A.J., Lopes, C., Marcos, N.T., Carvalheira, J., Reis, C.A. & Gartner. F. (2007). Sialyl Lewis x expression in canine malignant mammary tumours: correlation with clinicopathological features and E-cadherin expression. *BMC Cancer*, 7, 124.
- Potapenko, I.O., Haakensen, V.D., Luders, T., Helland, A., Bukholm, I., Sørli, T., Kristensen, V.N., Lingjaerde, O.C. & Børresen-Dale, A.L. (2010). Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Molecular Oncology* 4, 98–118.
- Priester, W.A. & McKay F.W. (1980). *The occurrence of tumors in domestic animals*. NCI Monograph 54, Bethesda, MD, National Cancer Institute.
- Queiroga, F.L., Alves, A., Pires, I. & Lopes, C. (2007). Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumors. *Journal of Comparative Pathology*, 136, 177–185.

- Queiroga, F. & Lopes, C. (2002). Tumores mamários caninos – novas perspectivas. *Congresso de Ciências Veterinárias, Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, Oeiras, 183-190.*
- Queiroga, F.L., Perez-Alenza, D., Silvan, G., Pena, L., Lopes, C.S. & Illera, J.C. (2010a). Serum and intratumoural GH and IGFI concentrations: Prognostic factors in the outcome of canine mammary cancer. *Research Veterinary Science, 89*, 396-403.
- Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M.D., Silvan, G., Pena, L., Lopes, C.S. & Illera, J.C. (2008). Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17beta-estradiol) in canine mammary tumours. *Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 110*, 76-82.
- Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M.D., Silvan, G., Pena, L., Lopes, C. & Illera, J.C. (2005b). Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Research, 25*(6B), 4269-4275.
- Queiroga, F.L., Pérez-Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C. & Illera, J.C. (2005a). Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 94* (1-3), 181-7.
- Queiroga, F.L., Pires, I., Lobo, L. & Lopes, C.S. (2010b). The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Research Veterinary Science, 88* (3), 441-445.
- Queiroga, F.L., Pires, I., Parente, M., Gregorio, H. & Lopes, C.S. (2011b). COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. *Veterinary Journal, 189*(1), 77-82.
- Queiroga, F.L., Raposo, T., Carvalho, M.I., Prada, J. Pires, I. (2011a). Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In Vivo, 25*(3), 455-65.
- Railo, M., Nordling, S., von Boguslawsky, K., Leivonen, M., Kyllonen, L. & von Smitten, K. (1993). Prognostic value of Ki-67 immunolabelling in primary operable breast cancer. *British Journal of Cancer, 68*, 579-583.
- Ressel, L., Millanta, F., Caleri, E., Innocenti, V.M. & Poli, A. (2009). Reduced Pten protein expression and its prognostic implications in canine and feline mammary tumors. *Veterinary Pathology 46*, 860-868.
- Rigas, B., Goldman, I.S. & Levine, L. (1993). Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 122*, 518–523.
- Ristimäki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., Joensuu, H., Isola, J. (2002). Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Research, 62*(3), 632–635.
- Rivera, P., Melin, M., Biagi, T., Fall, T., Häggström, J., Lindblad-Toh, K. & Von Euler, H. (2009). Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research, 69*, 8770-8774.
- Ross, J.S., Fletcher, J.A., Linette, G.P., Stec, J., Clark, E., Ayers, M., Symmans, W.F., Pusztai, L. & Bloom, K.J. (2003). The *Her 2/neu* gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist, 8*, 307-325.

- Rossmeisl Junior, J.H., Robertson, J.L., Zimmerman, K.L., Higgins, M.A., & Geiger, D.A. (2009). Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in canine intracranial meningiomas. *Veterinary Comparative Oncology*, 7, 173-80.
- Rudnick, J.A., Arendt, L.M., Klebba, I., Hinds, J.W., Iyer, V., Gupta, P.B., Naber, S.P. & Kuperwasser, C. (2011). Functional heterogeneity of breast fibroblasts is defined by a prostaglandin secretory phenotype that promotes expansion of cancer-stem like cells. *PLoS One*, 6(9), e24605.
- Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Uchida, K., Miyoshi, N. & Hayashi T. (1999). Immunohistochemical analysis of *c-Yes* and *c-ErbB-2* oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61, 27-32.
- Rutteman, G.R., Misdorp, W., Blankenstein, M.A. & Van Den Brom, W.E. (1988). Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *British Journal of Cancer*, 58(5), 594-9.
- Rutteman, G.R., Withrow, S.J. & MacEwen, E.G. (2001). Tumors of the mammary gland. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), *Small animal clinical oncology* (3rd ed.). (pp.455-477). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R.L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Kato, H., Kondo, M. & Hla, T. (1995). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Research*, 55, 3785–3789.
- Sartin, E., Barnes, S., Toivio-Kinnucan, M., Wright, J.C., Wolfe, L.G. (1993). Heterogenic properties of clonal cell lines derived from canine mammary carcinomas and sensitivity to tamoxifen and doxorubicin. *Anticancer Research*, 13, 229-236.
- Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan, E.S., Sasaki, Y., Kawano, S. & Hori, M. (1999). Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Laboratory Investigation*, 79, 1469–1477.
- Schneider, R., Dorn, CR. & Taylor, D.O. (1969). Factors Influencing Canine Mammary Cancer Development and Postsurgical Survival. *Journal of National Cancer Institute*, 69, 145-82.
- Sethi, G., Shanmugam, M.K., Ramachandran, L., Kumar, A.P. & Tergaonkar, V. (2012). Multifaceted link between cancer and inflammation. *Bioscience Reports*, 32(1), 1-15.
- Sheng, H., Shao, J., Morrow, J.D., Beauchamp, R.D. & Dubois, R.N. (1998). Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Research*, 58, 362–366.
- Singh-Ranger, G., Salhab, M. & Mokbel, K. (2008). The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer: review. *Breast Cancer Research Treatment*, 109 (2), 189-198.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L. & Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annals Reviews Biochemistry*, 69, 145–182.
- Sonnenschein, E.G., Glickman, L.T., Goldschmidt, M.H. & McKee, L.J. (1991). Body conformation, diet and risk of breast cancer in pet dogs: a casecontrol study, *American Journal of Epidemiology* 133 (7), 694-703.

- Sorenmo, K.U., Kristiansen, V.M., Cofone, M.A., Shofer, F.S., Breen, A.M., Langeland, M., Mongil, C.M., Grondahl, A.M., Teige, J. & Goldschmidt, M.H. (2009). Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary Comparative Oncology*, 7, 162–172.
- Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V. & Goldschmidt, M.H. (2010). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48(1), 85-97.
- Sorenmo, K.U., Shofer, F.S. & Goldschmidt, M.H. (2000). Effects of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14, 266-270.
- Souza, C.H.M., Toledo-Piza, E., Amorin, E., Barboza, A. & Tobias, K.M. (2009). Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Canadian Veterinary Journal*, 50(5), 506–510.
- Szabo S., Haislip, A.M. & Garry, R.F. (2005). Of Mice, Cats, and Men: Is Human Breast Cancer a Zoonosis? *Microscopic Research and Technique*, 68, 197-208.
- Tavares, W.L.F., Lavalle, G.E., Figueiredo, M.S., Souza, A.G., Bertagnolli, A.C., Viana, F.A.B., Paes, P.R.O., Carneiro, R.A., Cavalcanti, G.A.O., Melo, M.M. & Cassali, G.D. (2010). Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs; *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52-67.
- Teicher, B.A., Korb, T.T., Menon, K., Holden, S.A. & Ara, G. (1994). Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors as modulators of cancer therapies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 33, 515–22.
- Thun, M.J., Namboodiri, M.M. & Heath, Jr., C.W. (1991). Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *The New England Journal of Medicine*, 325, 1593–6.
- Tsuji, M. & Dubois, R.N. (1995). Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cell*, 83, 493–501.
- Tsuji, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawakata, H., Hori, M. & DuBois, R.N. (1998) Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93, 705–716.
- Turk, H.M., Camci, C., Sevinc, A., Bukyukberber, S., Sari, I. & Adli, M. (2012). Cyclooxygenase-2 Expression is not a Marker of Poor Survival in Lung. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(1), 315-318.
- Uva, P., Aurisicchio, L., Watters, J., Loboda, A., Kulkarni, A., Castle, J., Palombo, F., Viti, V., Mesiti, G., Zappulli, V., Marconato, L., Abramo, F., Ciliberto, G., Lahm, A., La Monica, N. & Rinaldis, E. (2009). Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*, 27, 10-135.
- Valsecchi, M.E., Pomerantz, S.C., Jaslow, R. & Tester, W. (2009). Reduced risk of bone metastasis for patients with breast cancer who use Cox-2 inhibitors. *Clinical Breast Cancer*, 9(4), 225-230.
- Vane, J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biology*, 43, 232–235.

- Velculescu, V.E. & El-Deiry, W.S. (1996). Biological and clinical importance of the *p53* tumor suppressor gene. *Clinical Chemistry*, 42, 858-868.
- Veldhoen, N., Watterson, J., Brash, M. & Milner, J. (1999). Identification of tumour-associated and germ line *p53* mutations in canine mammary cancer. *British Journal of Cancer*, 81, 409-415.
- VSSO. (2008). *Veterinary Society of Surgical Oncology: Canine mammary tumors*. Acedido em Mar 14, 2013, disponível em: http://www.vssso.org/Mammary_Tumors_-_Canine.html
- Wadell, W.R. & Loughry, R.W. (1983). Sulindac for polyposis of the colon. *Journal of Surgical Oncology*, 24, 83-7.
- Wakui, S., Muto, T., Yokoo, K., Yokoo, R., Takahashi, H., Masaoka, T., Hano, H., Furusato, M. (2001). Prognostic status of *p53* gene mutations in canine mammary carcinoma. *Anticancer Research*, 21, 611-616.
- Wang, D. & Dubois, R.N. (2006). Prostaglandins and cancer. *Gut*, 55(1), 115-122.
- Wang, D., Wang, H., Shi, Q., Katkuri, S., Walhi, W., Desvergne, B., Das, S.K. & Dey, S.K., DuBois, R.N. (2004). Prostaglandin E2 promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor. *Cancer Cell*, 6(3), 285-295.
- Wang, Y.X., Lee, C.H., Tjep, S., Yu, R.T., Ham, J., Kang, H. & Evans, R.M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, 113, 159-170.
- Wenbo, H., Gebre-Medhin, M., Gritli-Linde, A., Ohlsson, C., Isaksson, O.G., Tornell, J. (1997). Activation of the prolactin receptor but not the growth hormone receptor is important for induction of mammary tumours in transgenic mice. *Journal of Clinical Investigation*, 1, 2744-2751.
- Witton, C.J., Hawe, S.J., Cooke, T.G. & Bartlett, J.M. (2004). Cyclooxygenase 2 (COX-2) expression is associated with poor outcome in ER-negative, but not ER-positive, breast cancer. *Histopathology*, 45, 47-54.
- Woodhouse, E.C., Chuaqui, R.F. & Liotta, L.A., (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer*, 80, 1529-1537.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillet, E., Fleming, M.D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D. & Mc Keon, F. (1998). *p63*, a *p53* homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing and dominant-negative activities. *Molecular Cells*, 2, 305-316.
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., Mc Keon, F. (1999). *p63* is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, 398, 714-718.
- Zafirellis, K., Agrogiannis, G. & Zachaki, A. (2008). Prognostic value of COX-2 immunohistochemical expression evaluated by quantitative image analysis in colorectal cancer. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica, Scandinavica*, 116 (10), 912-922.

- Zatloukal, J., Lorenzova, J., Tichý, F., Necas, A., Kecová H. & Kohout, P., (2005). Breed and Age as Risk Factors for Canine Mammary Tumours. *Acta Veterinaria. Brunensis*, 74, 103-109.
- Zha, S., Yegnasubramanian, V., Nelson, W.G., Isaacs, W.B. & De Marzo, A.M. (2004). Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Letters*, 215 (1), 1-20.

Anexos

Anexo 1- Resumo da comunicação oral realizada no Congresso do Hospital Veterinário Montenegro (23 e 24 de fevereiro de 2013, Porto, Portugal)

DETEÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE COX-2 EM TUMORES MAMÁRIOS DA GATA E CADELA POR IMUNOHISTOQUÍMICA - POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Cunha, D.¹; Marques, D.¹; Peleteiro, M.C.¹; Ferreira, F.¹

¹ CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal

A cicloxigenase-2 (COX-2) é uma enzima que se encontra sobre-expressa em várias neoplasias humanas¹ para as quais está demonstrada a associação de níveis elevados desta proteína com formas clínicas mais agressivas e de pior prognóstico². Paralelamente, ensaios clínicos recentes têm revelado que a administração de fármacos inibidores de COX-2 reduz o risco de desenvolvimento de cancro de mama³ e diminui a sua capacidade metastática⁴. Em medicina veterinária, alguns trabalhos sugerem o envolvimento da COX-2 na carcinogénese mamária na gata^{5,6} e cadela^{7,8}, em especial, nos tumores de pior prognóstico^{5,7}.

Neste estudo pretendeu-se avaliar os níveis de expressão de COX-2 em neoplasias mamárias felinas e caninas, de forma a melhor equacionar a sua importância como futuro alvo terapêutico. A expressão de COX-2 foi avaliada em 21 tumores mamários de cada espécie, pela técnica de imunohistoquímica (IHQ), recorrendo ao uso do anticorpo anti-COX-2 (clone 33, BD Pharmingen, Erembodegem, Bélgica). O critério utilizado para classificação dos tumores positivos foi o da marcação igual ou superior a 10 % de células tumorais presentes nos cortes analisados.

Foi possível detetar em todas as neoplasias estudadas, a presença de células com sobre-expressão de COX-2 apesar de um número reduzido de tumores ter sido classificado como positivo (14% na cadela e 5% na gata). De salientar que na cadela, todos os tumores considerados positivos apresentaram um elevado grau de malignidade. Pensamos que mais investigação será necessária neste campo, em particular, no estabelecimento do limiar de positividade a partir do qual a terapêutica com inibidores de COX-2 poderá ser benéfica.

Bibliografia:

- 1 – Divvella, AKC., Challa, SR., & Tagaram, IK.. (2010). Pathogenic role of cyclooxygenase-2 in cancer. *Journal of Health Science*, **56**: 502-516.
- 2 – Ristimäki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., Joensuu, H., & Isola, J. (2002). Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Research*, **62**: 632–635.
- 3 – Ashok, V., Dash, C., Rohan, TE., Sprafka, JM. & Terry, PD. (2011). Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and breast cancer risk. *Breast*, **20**: 66-70.
- 4- Kang, J.H., Song, K.H., Jeong, K.C., Kim, S., Choi, C., Lee, C.H. & Oh, S.H. (2011). Involvement of COX-2 in the metastatic potential of chemotherapy-resistant breast cancer cells. *BMC Cancer*. **11**: 334-347.
- 5 – Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M., & Poli, A. (2006). COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment*, **98**: 115-120.
- 6 – Sayasith, K., Sirois, J., & Doré, M. (2009). Molecular characterization of feline COX-2 and expression in feline mammary carcinomas. *Veterinary Pathology*, **46**: 423-429.
- 7 - Queiroga, F., Pires, I., Lobo L., & Lopes S. C. (2009). The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science*, **88**: 441-445.
- 8 - D. A. Heller, C. A. Clifford, M. H. Goldschmidt, D. E. Holt, F. S. Shofer, A. Smith, & K. U. Soremno (2005). Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Veterinary Pathology*, **42**: 776-780.

Anexo 2 – Poster exposto no Congresso da European Society of Veterinary Oncology (ESVONC), (30 de maio a 1 de junho de 2013, Lisboa, Portugal)



COX-2 IN FELINE AND CANINE MAMMARY TUMOURS IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION

F. Ferreira, D. Cunha, D. Marques, S. Carvalho, J. Correia, M. Peleteiro

Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal (CIISA)
Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, Lisbon, Portugal



ESVONC Annual Congress 2013,
Lisbon, Portugal

Introduction

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an enzyme overexpressed during inflammatory response and in some neoplasias. A large number of studies sustain a role for COX-2 in tumourigenesis, mediated through the production of PGE2 that acts inhibiting apoptosis, promoting cell proliferation, stimulating angiogenesis and, decreasing immunity^{1,2}. High levels of COX-2 in many human tumours have been associated with clinically aggressive behaviour and poor prognosis^{3,4}. Several studies also suggest COX-2 involvement in feline and canine mammary gland carcinogenesis.

As far as we could evaluate there is a high variability in published results regarding COX-2 expression, apparently due to differences in sample processing and IHC protocols, including the antibodies used and their concentration; various scoring systems and cut-off levels. Our goal, in this study, was to evaluate COX-2 expression in feline and canine mammary tumours, in order to investigate its importance as a therapeutic target and contribute to the standardization in the evaluation of the expression of this enzyme.

Materials and Methods

The expression of COX-2 was analyzed in 21 tumour tissue samples from each species by immunohistochemistry (IHC). In this study two anti-COX-2 antibodies were used (Clone 33, BD Pharmingen, Erembodegem, Belgium; Clone SP21, Biocare Medical, USA), following the protocols described in Table 1. In order to define the degree of positivity of each neoplasia, ten 20x fields were evaluated for each tumour, with a minimum cell count of 1000 cells per tumour. Labelling was scored semi-quantitatively as presented in Table 2. Canine uterus with pyometra was used as a positive control.

Clone 33, BD Pharmingen, Erembodegem, Belgium:

- ✓ Antibody previously used in canine mammary tumours^{5,6}.
- ✓ 96% homology between canine and feline COX-2⁷.

Clone SP21, Biocare Medical, USA:

- ✓ Antibody previously used in both species, in mammary tumour samples^{8,9}.

Antibody	Dilution/ Incubation period	Antigen retrieval method
Clone 33, BD Pharmingen, Erembodegem, Belgium	1:100 1h	Citrate buffer pH=6, microwave, 700 W, 15 min
Clone SP21, Biocare Medical, USA	1:75 Overnight (16h)	Citrate buffer pH=6, pressure cooker, 2.5 min

Table 1 – Primary antibodies and protocols used.

% of tumour cells staining positive for COX-2	Score
<10%	0
10-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Table 2 – Scoring system adopted.

Results

All tumour samples showed COX-2 expression. IHC performed with the clone 33 revealed positive immunostaining in 14% (3/21) and 4,7% (1/21) of the tumours evaluated in the bitch and queen, respectively. The labeling was mainly cytoplasmic and perinuclear, varying from strong (+++) to very strong (+++). In contrast, most of the samples evaluated with clone SP21 were positive (Figure 1), showing either cell membrane labeling or cytoplasmic and perinuclear staining. This last pattern was frequently for some tumours regardless of the antibody used (Figure 2). The results are summarized in Table 3. Well-differentiated tumours in both species showed membrane staining similar to the pattern presented by the non-neoplastic adjacent mammary gland (Figure 3). In the bitch, cytoplasmic and perinuclear staining was associated with a higher degree of malignancy, larger tumour size, ulceration and lymph node metastases. In the queen, there was also immunoreactivity in spindle stromal cells with both antibodies.

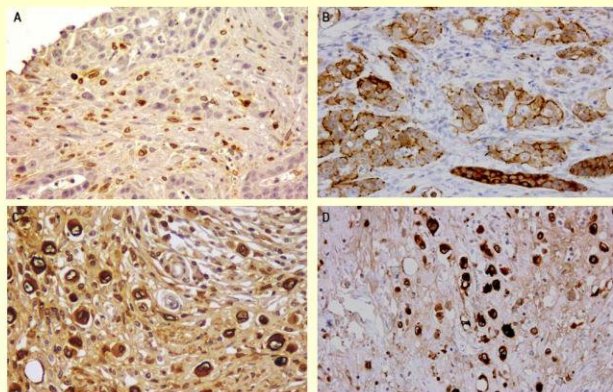


Figure 2: Perinuclear and cytoplasmic labelling patterns obtained with Clone 33 and Clone SP21. A – Feline tubular carcinoma, grade III, score 1, Clone 33 (x200); B – Feline tubular carcinoma, grade III, score 4, Clone SP21 (x200); C – Canine anaplastic carcinoma, grade III, score 2, Clone 33 (x200); D – Canine anaplastic carcinoma, grade III, score 4, Clone SP21 (x200). Labelling

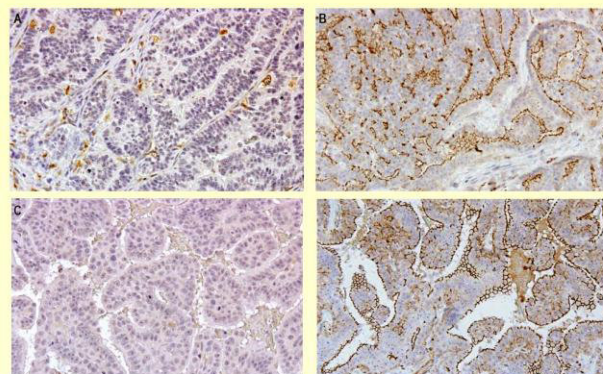


Figure 1: Labelling differences obtained by the use of the two antibodies anti-COX 2 (Clone 33 and Clone SP21). A – Feline tubular carcinoma, grade I, score 0, Clone 33 (x200); B – Feline tubular carcinoma, score 4, grade I, Clone SP21 (x100); C – Canine papillary carcinoma, grade II, score 0, Clone 33 (x200); D – Canine papillary carcinoma, grade II, score 4, Clone SP21 (x100).

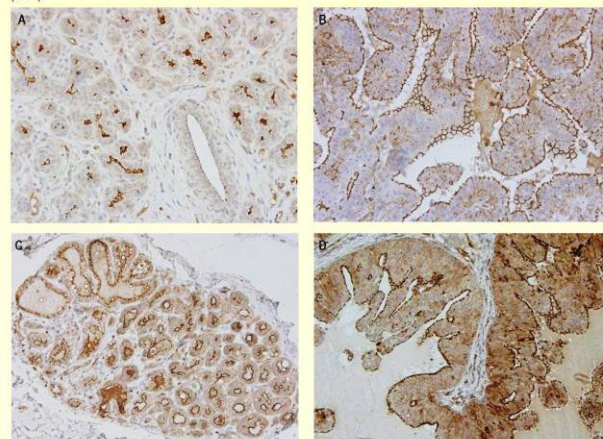


Figure 3: Membrane labelling obtained with Clone SP21. A – Canine non-neoplastic mammary gland (x100). B – Canine papillary carcinoma, grade II (x100); C – Feline non-neoplastic mammary gland (x100). D – Feline tubulopapillary carcinoma, grade I (x100).

		COX-2 expression				
Score		0	1	2	3	4
Clone 33	Cat	20 (95,2%)	1 (4,8%)	0	0	0
	Dog	18 (80%)	2 (9,5%)	1 (4,7%)	0	0
Clone SP21	Cat	1 (4,8%)	1 (4,8%)	2 (9,5%)	5 (23,8%)	12 (57,1%)
	Dog	0	1 (4,8%)	0	0	20 (95,2%)

Table 3 – Immunohistochemical results

Discussion

The results obtained are comparable with the ones reported by other authors^{7,8,10} and have shown that positivity to COX-2 in mammary tissue samples can vary according to the antibody anti-COX-2 used. Apart from positivity, other scoring values must be used involving the type of labelling. Membrane labelling seems to be associated with more differentiated tumours and cytoplasmic and perinuclear staining with the ones exhibiting more obvious signs of malignancy, both histologically and clinically.

References

- 1 – Doré M (2011). Cyclooxygenase-2 Expression in Animal Cancers. Veterinary Pathology, 48 (1), 254-265; 2 – Wang D and Dubois RN (2006). Prostaglandins and cancer. Gut - International Journal of Gastroenterology and Hepatology, 55 (1), 115-122; 3 – Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salmenni T, Haglund C, Joensuu H & Isola J (2002). Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. Cancer Research, 62(3), 632-635; 4 – Zerkowicz MP, Camp RL, Barless BA, Rimm DL and Chung GG (2007). Quantitative analysis of breast cancer tissue microarrays shows high cox-2 expression is associated with poor outcome. Cancer Investigation, 25, 19-26; 5 – Queiroga F, Pires I, Lobo L & Lopes SC (2010). The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. Research in Veterinary Science, 88: 441-445; 6 – Queiroga FL, Pires I, Parente M, Gregorio H, Lopes CS. (2011). COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. Veterinary Journal, 189, 77-82; 7 – Sayasath K, Sirois J & Doré M. (2009). Molecular characterization of feline Cox-2 and expression in feline mammary carcinomas. Veterinary Pathology, 46(3), 423-429; 8 – Lavalle GE, Bertagnoli AC, Tavares LF, Cassali GD (2009). Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. Veterinary Pathology, 46, 1275-1280; 9 – Sousa RPM (2010). A expressão da COX-2 em patologias da glândula mamária da gata. Dissertação de mestrado em Métodos Biomoleculares. Universidade de Aveiro, Aveiro.

Acknowledgements

The authors wish to thank Prof. Luísa Mateus (CIISA, FMV/UTL) for supplying the anti-COX2 antibody, clone 33. They also wish to thank colleagues Maria João Soares, João Cota (CIISA, FMV/UTL) and A. Menarini Diagnostics, Lda, for providing the anti-COX2 antibody, clone SP21 and Merial Portuguesa, Saúde Animal, for providing detection system.



Fundação para a Ciência e a Tecnologia